

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO UNIVERSITÁRIO NORTE DO ESPÍRITO SANTO
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE TROPICAL

ANDRÉ FELIPE COSTA SOUZA

EFEITO DO SELÊNIO (Se) SOBRE O APARATO FOTOSSINTÉTICO DE *Billbergia zebrina* (HERBERT) LINDLEY (BROMELIACEAE) *IN VITRO* E SUA AÇÃO ATENUANTE FRENTE AO ESTRESSE POR ZINCO (Zn).

Dissertação de Mestrado em Biodiversidade Tropical

São Mateus, abril de 2018

EFEITO DO SELÊNIO (Se) SOBRE O APARATO FOTOSSINTÉTICO DE *Billbergia zebrina* (HERBERT) LINDLEY (BROMELIACEAE) *IN VITRO* E SUA AÇÃO ATENUANTE FRENTE AO ESTRESSE POR ZINCO (Zn).

ANDRÉ FELIPE COSTA SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical, na área de concentração Ecologia Tropical.

Orientador: DSc. Antelmo Ralph Falqueto

Coorientadores: DSc. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo e DSc. João Paulo Rodrigues Martins.

São Mateus, abril de 2018

Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)
(Divisão de Biblioteca Setorial do CEUNES - BC, ES, Brasil)
Bibliotecária: Marilzete de Almeida – CRB-6 ES-000721/O

S729e Souza, André Felipe Costa, 1992-
Efeito do selênio (Se) sobre o aparato fotossintético de
Billbergia zebrina (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) *in vitro* e sua
ação atenuante frente ao estresse por zinco (Zn / André Felipe
Costa Souza. – 2018.
74 f. : il.

Orientador: Antelmo Ralph Falqueto.
Coorientador: Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo; João
Paulo Rodrigues Martins.
Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical) –
Universidade Federal do Espírito Santo, Centro Universitário
Norte do Espírito Santo.

1. Bromélia. 2. Cultivo in vitro. 3. Fluorescência. 4. Clorofila. 5.
Fisiologia vegetal. I. Falqueto, Antelmo Ralph. II. Gontijo, Andreia
Barcelos Passos Lima. III. Martins, João Paulo Rodrigues. IV.
Universidade Federal do Espírito Santo. Centro Universitário
Norte do Espírito Santo. V. Título.

CDU: 502

ANDRÉ FELIPE COSTA SOUZA


EFEITO DO SELÊNIO (Se) SOBRE O APARATO FOTOSSINTÉTICO DE
Billbergia zebrina (HERBERT) LINDLEY (BROMELIACEAE) *IN VITRO* E SUA
AÇÃO ATENUANTE FRENTE AO ESTRESSE POR ZINCO (Zn)

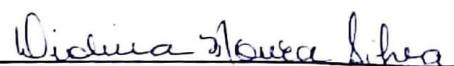
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade Tropical da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biodiversidade Tropical.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. Antelmo Ralph Falqueto
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador


Prof.ª Dr.ª Mônica Maria Pereira
Tognella
Universidade Federal do Espírito Santo


Prof.ª Dr.ª Diolinda Moura Silva
Universidade Federal do Espírito Santo

*A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o
uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.*

Platão

Agradecimentos

À Universidade Federal do Espírito Santo (UFES) e ao Centro Universitário Norte do Espírito Santo (CEUNES) pela oportunidade;

Ao Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Tropical (PPGBT) pela formação;

Ao Laboratório de Ecofisiologia Vegetal (LEV) e ao Laboratório de Cultura de Tecidos Vegetais pelo espaço;

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Espírito Santo (FAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro;

Ao meu querido orientador, Prof. DSc. Antelmo Ralph Falqueto pelas instruções;

Aos meus coorientadores Prof (a). DSc. Andreia Barcelos Passos Lima Gontijo e DSc. João Paulo Rodrigues Martins pelo suporte;

Aos honráveis professores do PPGBT pelos ensinamentos;

À Secretaria Única de Pós Graduação do CEUNES (SUPGRAD) pela dedicação;

Aos colegas de laboratório pela assistência;

Aos amigos e colegas de classe pelo apoio;

À minha família por ser o meu alicerce...

O MEU MAIS SINCERO E PROFUNDO AGRADECIMENTO.

Sumário

Resumo	IX
Abstract.....	X
1. Introdução geral.....	11
1.1. Referências	15
2. Capítulo I: Selênio melhora a dinâmica de transporte e conservação de energia no aparato fotossintético de <i>Billbergia zebrina</i> (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) <i>in vitro</i>	19
Resumo	19
Abstract.....	20
Lista de tabelas	21
Lista de figuras	22
2.1. Introdução.....	24
2.2. Material e métodos	25
2.2.1. <i>Exposição de material vegetal ao selênio durante o crescimento in vitro</i>	25
2.2.2. <i>Análise de crescimento</i>	25
2.2.3. <i>Análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos</i>	25
2.2.4. <i>Análise da fluorescência da clorofila a</i>	26
2.2.5. <i>Análise estatística</i>	28
2.3. Resultados	28
2.4. Discussão.....	33
2.5. Conclusão	40
2.6. Referências	41
3. Capítulo II: Ação atenuante do selênio (Se) sobre o aparato fotossintético de <i>Billbergia zebrina</i> (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) frente ao excesso e escassez de zinco (Zn) <i>in vitro</i>.....	49
Resumo	49
Abstract.....	50
Lista de tabelas	51
Lista de figuras	52
3.1. Introdução.....	53
3.2. Material e métodos	54
3.2.1. <i>Material vegetal e exposição aos tratamentos com selênio e/ou zinco durante o crescimento in vitro</i>	54
3.2.2. <i>Análise de crescimento</i>	54

3.2.3.	<i>Análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos</i>	55
3.2.4.	<i>Análise da fluorescência da clorofila a</i>	55
3.2.5.	<i>Análise estatística</i>	55
3.3.	Resultados	55
3.4.	Discussão	59
3.5.	Conclusão	65
3.6.	Referências	67

Resumo

Apesar dos efeitos benéficos, o selênio (Se) não é um elemento essencial para as plantas e seus mecanismos de ação ainda não estão claros. O zinco (Zn), por sua vez, é um micronutriente essencial envolvido em várias funções celulares. O excesso de Zn pode ser tóxico para as plantas e o Se, por meio de diferentes mecanismos de desintoxicação, tem sido citado como um atenuante aos efeitos deletérios de fatores abióticos como os metais pesados. Neste contexto, propôs-se caracterizar a ação do Se sobre o aparato fotossintético de Bilbergia zebrina (Herbert) Lindley e sua potencial ação atenuante frente ao excesso e escassez de Zn *in vitro*. No primeiro experimento, brotos laterais de B. zebrina foram cultivados em meio MS com diferentes concentrações de Se (0, 2, 4 e 16 μM). Avaliou-se, após 75 dias, a concentração de pigmentos fotossintéticos, produção de biomassa e fluorescência de clorofila *a*. Esse estudo demonstrou que, em baixas concentrações (4 μM), o Se aumenta capacidade potencial de conservação de energia do aparato fotossintético, mantém as reações de transporte de energia do FSII e melhora a dinâmica de transporte de elétrons entre o intersistema e o FSI. Ainda assim, observou-se que B. zebrina não tolera concentrações iguais ou superiores a 16 μM de Se, apresentando reduções no crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e prejuízo ao aparato fotossintético. No segundo experimento, brotos laterais de B. zebrina foram cultivados em meio MS com diferentes concentrações de Zn isoladas (0, 30 e 300 μM) e combinadas com 4 μM de Se (0+Se, 30+Se e 300+Se μM), definida a partir do primeiro experimento. Novamente, Após 75 dias, avaliou-se o estado nutricional das amostras, a concentração de pigmentos fotossintéticos e a fluorescência de clorofila *a*. Este estudo demonstrou que o Se confere ao aparato fotossintético de B. zebrina a capacidade de melhorar o aproveitamento de energia, estabilizando a dinâmica de absorção, captura e transporte. Assim, independente da escassez ou excesso de Zn, o Se protege as funções do FSII. Ainda, de acordo com o teste JIP, a absorção de Zn proporcional às concentrações utilizadas, não causou interferências significativas na funcionalidade ou estrutura do aparato fotossintético. Dessa forma, pode-se considerar que a espécie B. zebrina exiba eventual capacidade para acumulação de Zn, apresentando, dessa forma, potenciais características para biomonitoramento.

Palavras-chave: bromélia, fluorescência da clorofila *a*, aparato fotossintético, cultivo *in vitro*, fisiologia vegetal.

Abstract

*Despite the beneficial effects, selenium (Se) is not an essential element for plants and its action mechanisms are still unclear. Zinc (Zn), in turn, is an essential micronutrient involved in various cellular functions. Excess Zn can be toxic to plants and Se, through different detoxification mechanisms, has been cited as an attenuating to the deleterious abiotic factors effects such as heavy metals. In this context, it was proposed to characterize the Se action on the *Bilbergia zebrina* (Herbert) Lindley photosynthetic apparatus and its potential attenuating action against the excess and scarcity of Zn in vitro. In the first experiment, *B. zebrina* lateral shoots were grown in MS medium with different concentrations of selenium (0, 2, 4 and 16 μM). After 75 days the photosynthetic pigments concentration, growth traits and chlorophyll a fluorescence were evaluated. This study demonstrated that in low concentrations, selenium increases the photosynthetic apparatus potential energy conservation capacity, maintains the FSII energy transport reactions stability and improves the electron transport dynamics between the intersystem and the FSI. Still, we observed that *B. zebrina* does not tolerate concentrations equal to or greater than 16 μM of selenium, presenting reductions in growth, photosynthetic pigments content and photosynthetic apparatus impairment. In the second experiment, *B. zebrina* lateral shoots were cultured in MS medium with different Zn concentrations isolated (0, 30 and 300 μM) and combined with 4 μM Se (0 + Se, 30 + Se and 300 + Se μM), defined from previous studies. After 75 days, the nutritional status of the samples, the concentration of photosynthetic pigments and the chlorophyll a fluorescence were evaluated. This second study demonstrated that Se gives the *B. zebrina* photosynthetic apparatus the ability to improve the energy utilization, stabilizing the dynamics of absorption, capture and transport. Thus, independent of the Zn scarcity or excess, Se protects FSII functions. Furthermore, according to the JIP test, the Zn absorption proportional to the concentrations used, did not cause significant interferences in the photosynthetic apparatus functionality or structure. Thus, it can be considered that the species *B. zebrina* exhibits eventual capacity for Zn accumulation, thus presenting potential characteristics for biomonitoring.*

Keywords: bromeliad, chlorophyll a fluorescence, photosynthetic apparatus, *in vitro* culture, plant physiology.

1. Introdução geral

Devido à sua importância fisiológica e toxicológica, o selênio (Se) tornou-se um elemento de interesse em estudos com plantas. Benefícios do Se, quando em baixas concentrações, tem sido descritos em diferentes espécies vegetais (KÁPOLNA *et al.*, 2009). Dentre eles, o aumento da biomassa, diminuição de danos oxidativos, incremento da concentração de pigmentos fotossintéticos, regulação de potencial hídrico e estímulo da atividade antioxidante (HARTIKAINEN *et al.*, 2000; EKELUND e DANILOV, 2001; VALKAMA *et al.*, 2003; SEPPANEN *et al.*, 2003; KUZNETSOV *et al.*, 2003;). Pesquisadores têm-se reportado ao Se como um elemento capaz de aumentar a atividade de enzimas como a superóxido dismutase (SOD) e guaiacol peroxidase (GPX), que ativam mecanismos de proteção contra o estresse oxidativo. Também é relatado que o Se exerça um efeito antioxidante direcionado para uma diminuição de espécies reativas de oxigênio (ERO's) intracelulares induzindo a biossíntese de prolina e peroxidase (KUZNETSOV *et al.*, 2003).

O Se apresenta uma ampla gama de aplicações na indústria, sendo usado em eletrônicos e produtos para fotografia, semicondutores, equipamentos de imagem médica, fotocopiadoras e células solares (DHILLON *et al.*, 2003). A deficiência e a toxicidade de Se existe em todo o mundo, dependendo da sua disponibilidade no ambiente (ZHANG *et al.*, 2007). Mesmo uma contaminação de baixo nível, se presente numa escala suficientemente grande, pode representar prejuízos ao ambiente (LINDBLOM *et al.*, 2012), acarretando impacto sobre saúde humana, produtividade agrícola e estabilidade de ecossistemas naturais.

Do ponto de vista ecotoxicológico, as plantas diferem em suas habilidades para acumular Se. Algumas espécies podem acumular níveis elevados de Se, no entanto a maioria das plantas não são acumuladoras, tornando-se sensíveis a este elemento quando em solos seleníferos (LAYU *et al.*, 2012). A toxicidade por selênio pode comprometer a fisiologia das plantas provocando um crescimento reduzido e atrofiado, bem como descamação e secagem de folhas. Esses efeitos deletérios podem ser atribuídos à formação excessiva de selenoproteínas inespecíficas dentro dos seus tecidos (TERRY *et al.*, 2000). No entanto, há evidências de que o estresse oxidativo induzido por Se também contribui para a toxicidade em plantas (VAN HOEWYK, 2013). Os mecanismos por trás desse estresse envolvem a capacidade pró-oxidante do Se para induzir a oxidação de tióis e simultaneamente gerar radicais livres de superóxido e peróxido de hidrogênio (CHEN *et al.*, 2007). Portanto, a desintoxicação da toxicidade induzida por Se também pode envolver a capacidade antioxidante das plantas (WANG *et al.*, 2016).

O zinco (Zn) é um micronutriente essencial para plantas e seres humanos. É um componente estrutural de muitas enzimas catalíticas e fatores de transcrição, de modo que doenças específicas estão associadas à sua deficiência (BROADLEY *et al.*, 2007; CHASAPIS *et al.*, 2012). As plantas, assim como os seres humanos ou qualquer outro organismo, dependem de um limite de zinco para dirigir funções celulares. Mais de mil proteínas diferentes foram encontradas associadas com zinco para funcionalidade de *Arabidopsis thaliana* (KRÄMER *et al.*, 2007). Enzimas envolvidas na síntese e manutenção de DNA e RNA também requerem este micronutriente (HANSCH e MENDEL, 2009). No entanto, em quantidades excessivas, o zinco é capaz de substituir outros metais ou se associar a proteínas e enzimas indesejadas, resultando em sua inativação. Dessa forma, o zinco é essencial para as funções celulares, mas é tóxico em altas concentrações.

Atualmente, grandes áreas em todo o mundo tem sido contaminadas com metais pesados (NAGAJYOTI *et al.*, 2010; NEILSON e RAJAKARUNA, 2015). A contaminação do ar, do solo e da água por metais pesados advindo de diferentes atividades antropogênicas como a mineração e fundição de minérios metálicos (CUI e DU, 2010; BEYER *et al.*, 2013), lixiviação de metais a partir de lixo proveniente de atividade de mineração (CAPPUYNS *et al.*, 2014), industrial (BROKBARTOLD *et al.*, 2011) e doméstico, práticas de eliminação de resíduos (LOPES *et al.*, 2011), fertirrigação com água residuária e aplicação de lodo resultante de processos de tratamento de efluentes é um relevante problema ambiental. A presença de metais no ambiente pode provocar severas contaminações e o comprometimento da qualidade da água subterrânea, do solo agricultável e da biodiversidade por longos períodos de tempo. Além disso, tende a comprometer a capacidade dos ecossistemas de recuperar a sua condição de equilíbrio.

O dano induzido por quantidades tóxicas de metais pesados nas plantas pode ser atribuído a diferentes causas que geralmente agem em conjunto e podem incluir danos diretos do metal e/ou indiretamente, por meio do estresse oxidativo induzido (VIEHWEGGER *et al.*, 2014). Os efeitos danosos de metais pesados incluem diminuição da concentração de clorofila (resultante da redução da biossíntese ou aumento da degradação), alteração do equilíbrio hídrico, diminuição da atividade de várias enzimas, fechamento estomático, desaceleração da taxa de fotossíntese e redução da absorção de nutrientes minerais essenciais (NAGAJYOTI *et al.*, 2010).

As plantas desenvolveram estratégias diferentes para lidar com altas concentrações de metais pesados como o zinco, geralmente consideradas fitotóxicas nos solos. A hiperacumulação de

metais pesados é uma dessas estratégias (BERT *et al.*, 2002; VERBRUGGEN *et al.*, 2009; HANIKENNE e NOUET, 2011; MERLOT *et al.*, 2018). Espécies vegetais hiperacumuladoras de metais são modelos valiosos para examinar essa complexa via metabólica e revelar os principais atores na distribuição e tolerância de metais nos tecidos vegetais (BERT *et al.*, 2002).

Estudo anteriores demonstraram que doses adequadas de Se podem proteger plantas contra os danos causados por metais pesados. Os mecanismos de desintoxicação de metais pesados por Se podem estar ligados à inibição da absorção e translocação desses elementos das raízes para a parte aérea e/ou a transformação em espécies não tóxicas (FENG *et al.*, 2013). A regulação da absorção e redistribuição de alguns elementos essenciais pelo Se é considerado um mecanismo importante para ativar antioxidantes, reduzir os níveis de ERO's, melhorando a tolerância da planta ao estresse. No entanto, a informação a respeito os efeitos do Se sobre a absorção de elementos essenciais em plantas estressadas é insuficiente (FENG *et al.*, 2013). Em alguns casos, a adição de Se estimulou a absorção de certos metais pesados em plantas, como arsênio (As) em *Pteris vittata* L. (SRIVASTAVA *et al.*, 2009) e alumínio (Al) em azevém (CARTES *et al.*, 2010). Em ambos os trabalhos, também foi observada a desintoxicação mediada por Se contra a toxicidade de Al e As. Os autores sugeriram que este efeito foi parcialmente relacionado à capacidade antioxidativa melhorada. No entanto, a causa contributiva pode ser a formação de compostos contendo ligações do Se com os metais pesados, reduzindo assim a sua toxicidade.

Diversos estudos relataram que o Se pode melhorar a fotossíntese nas plantas. O Se induziu incremento ao potencial respiratório e eficiência de conversão de energia do FSII em folhas de batata (*Solanum tuberosum* L.) (GERM *et al.*, 2007). Ainda, melhorou os processos metabólicos relacionados ao rendimento quântico fotoquímico e à respiração mitocondrial, aumentou as taxas de fotossíntese, concentração de CO₂ intercelular e a eficiência da transpiração em arroz (*Oryza sativa* L.) (GERM *et al.*, 2009). Em plantas de trigo sarraceno (*Fagopyrum tataricum*) tratadas com Se foi observado maior atividade do sistema de transporte de elétrons em comparação com os controles (KREFT *et al.*, 2013).

A técnica de avaliação da emissão da fluorescência da clorofila *a* tem sido extensivamente utilizada como uma ferramenta não invasiva eficiente na investigação das reações fotoquímicas da fotossíntese associadas a diversos cenários ecofisiológicos (STRASSER *et al.*, 2004; STRASSER *et al.*, 2007; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER 2008; JIANG *et al.*, 2009; ZUBEK *et al.*, 2009; YUSUF *et al.*, 2010). A derivação de parâmetros biofísicos de acordo

com a Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas está baseada na ligação entre o comportamento energético do aparato fotossintético e os sinais de fluorescência. Dessa forma, é possível um estudo criterioso de todos os processos da distribuição de energia em quaisquer aparatos fotossintéticos. É possível, ainda, identificar alterações na estrutura e funcionalidade das unidades dos fotossistemas. O estudo da fluorescência da clorofila *a* permite o acesso em riqueza de detalhes aos processos ecofisiológicos de dissipação fotoquímica e não fotoquímica da energia de excitação que ocorre nas membranas dos tilacóides (KRAUSE e WEIS, 1991; ROSENQVIST e VAN KOOTEN 2003; OUKARROUM *et al.*, 2007; REDILLAS *et al.*, 2011; STIRBET e GOVINDJEE 2011), o que é de grande importância no que tange questionamentos ecológicos.

Plantas epífitas como a bromélia *Bilbergia zebrina* (Herbert) Lindley, utilizada como modelo nesse estudo, têm uma característica específica em relação às demais, na medida em que a absorção de metais pesados ocorre pelo ar. Assim, praticamente toda a água e nutrientes minerais são fornecidos pela atmosfera. Por esse motivo, o conteúdo do seu tecido reflete bem os níveis atmosféricos de alguns elementos tóxicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). A espécie *Bilbergia zebrina* (Herbert) Lindley é nativa da Mata Atlântica (Reitz, 1983). Para além da sua importância ecológica, esta espécie também apresenta importante valor comercial como planta ornamental, devido à beleza de suas folhas e flores. Como efeito da perda de habitat e exploração, é considerada uma espécie vulnerável em algumas regiões do Brasil.

As técnicas de propagação *in vitro* têm sido amplamente utilizadas para a multiplicação rápida de várias espécies de plantas economicamente importantes ou espécies ameaçadas de extinção, como as da família Bromeliaceae (GUERRA e VESCO, 2010). No contexto deste trabalho a técnica de cultura *in vitro* é vantajosa, pois, permite isolar os efeitos do selênio e do zinco dos efeitos de outros estresses no metabolismo da planta.

Estudos que possam ajudar a esclarecer os mecanismos fisiológicos subjacentes à toxicidade causada pelo Se, bem como da mitigação de estresses pelo uso de doses adequadas de Se sobre a cadeia de transporte de elétrons nas plantas ainda são escassos (FENG *et al.*, 2013). Neste cenário, o objetivo dessa pesquisa é caracterizar a ação do selênio sobre o aparato fotossintético de *B. zebrina* e sua potencial ação atenuante frente ao excesso e escassez de zinco *in vitro*.

1.1. Referências

- BERT, V.; BONNIN, I.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; DE LAGUERIE, P.; PETIT, D. Do *Arabidopsis halleri* from non metallicolous populations accumulate zinc and cadmium more effectively than those from metallicolous populations? **New Phytologist**, v.155, p. 47–57. 2002.
- BROADLEY M. R.; WHITE, P. J.; HAMMOND, J. P.; ZELKO, I.; LUX, A. Zinc in plants. **New Phytologist**, v. 173, p. 677–702. 2007.
- CARTES, P.; JARA, A. A.; PINILLA, L.; ROSAS, A.; MORA, M. L. Selenium improves the antioxidant ability against aluminium-induced oxidative stress in ryegrass roots. **Annals of Applied Biology**, v. 156, p. 297–307. 2010.
- CHASAPIS, C. T.; LOUTSIDOU, A. C.; SPILIOPOULOU, C. A.; STEFANIDOU M. E. Zinc and human health: an update. **Archives of Toxicology**, v. 86, p. 521–534. 2012.
- CHEN, J. J.; BOYLAN, L. M.; WU, C. K.; SPALLHOLZ, J. E. Oxidation of glutathione and superoxide generation by inorganic and organic selenium compounds. **BioFactors**, v. 31, p. 55–66. 2007.
- DHILLON, K. S.; DHILLON, S. K. Distribution and management of seleniferous soils. **Advances in Agronomy**, v. 79, p. 119–184. 2003.
- EKELUND, N. G. A.; DANILOV R. A. The influence of selenium on photosynthesis and light-enhanced dark respiration (LEDR) in the flagellate *Euglena gracilis* after exposure to ultraviolet radiation. **Aquatic Sciences**, v. 63, p. 457–465. 2001.
- FENG, R.; CHAOYANG W.; SHUXIN T. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 58–68. 2013.
- FIGUEIREDO, A. M. G.; SAIKI, M.; TICIANELLI, R. B.; DOMINGOS, M.; ALVES, E. S.; MARKET, B. Determination of trace elements in *Tillandsia usneoides* by neutron activation analysis for environmental biomonitoring. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 249, p. 391–395. 2001.
- GERM, M.; KREFT, I.; GABERSCIK, A. UV-B radiation and selenium affected energy availability in green alga *Zygnema*. **Biologia**, v. 64, p. 676-679. 2009.
- GERM, M.; SLOVENIA, L.; KREFT, I. Combined effects of selenium and drought on photosynthesis and mitochondrial respiration in potato. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 45, p. 162-167. 2007.
- GUERRA, M.P.; VESCO, L. L. D. Strategies for the micropropagation of bromeliads. In: Jain, S.M.; Ochatt, S. J. (eds) **Protocols for in vitro propagation of ornamental plants: methods in molecular biology**. Humana Press, New York, 2010, pp 47–66.
- HANIKENNE, M.; NOUET, C. Metal hyperaccumulation and hypertolerance: a model for plant evolutionary genomics. **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p. 252–259. 2011.

- HÄNSCH, R.; MENDEL, R. R. Physiological functions of mineral micronutrients (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo, B Cl). **Current Opinion in Plant Biology**, v. 12, p. 259–66. 2009.
- HARTIKAINEN, H.; XUE, T.; PIIRONEN, V. Selenium as an anti-oxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant Soil**, v. 225, p. 193–200. 2000.
- JIANG, H. X.; CHEN, L. S.; ZHENG, J.G. Aluminum-induced effects on Photosystem II photochemistry in *Citrus* leaves assessed by the chlorophyll *a* fluorescence transient. – **Tree Physiology**, v. 28, p. 1863-1871. 2008.
- KÁPOLNA, E.; HILLESTRØM, P. R.; LAURSEN, K. H.; HUSTED S.; LARSEN, E. H. Effect of foliar application of selenium on its uptake and speciation in carrot. **Food Chemistry**, v. 115(4), p. 1357–1363. 2009.
- KRAMER, U.; TALKE, I. N.; HANIKENNE, M. Transition metal transport. **FEBS Letters**, v. 581, p. 2263–2272. 2007.
- KRAUSE, G. H.; VIRGO, A.; WINTER, K. High susceptibility to photoinhibition of young leaves of tropical forest trees. **Planta**, v. 197, p. 583-591. 1995.
- KREFT, I.; MECHORA, Š.; GERM, M.; STIBILJ, V. Impact of selenium on mitochondrial activity in young Tartary buckwheat plants. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 63, p. 196-199. 2013.
- KUZNETSOV, V. V.; KHOLODOVA, V. P.; KUZNETSOV, V. I. V.; YAGODIN, B. A. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. **Doklady Biological Sciences**, v. 390, p. 266–268. 2003.
- LAVU, R. V. S.; DU LAING, G.; VAN DE WIELE, T.; PRATTI, V. L.; WILLEKENS, K.; VANDECASTEELE, B.; TACK, F. Fertilizing soil with selenium fertilizers: impact on concentration, speciation, and bioaccessibility of selenium in leek (*Allium ampeloprasum*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 60, p. 10930–10935. 2012.
- LINDBLOM, S. D.; VALDEZ-BARILLAS, J. R.; FAKRA, S.; MARCUS, M. A.; WANGELINE, A. L.; PILON-SMITS, E. A. H. Influence of microbial associations on selenium localization and speciation in roots of *Astragalus* and *Stanleya* hyperaccumulators. **Environmental and Experimental Botany** v. 88, p. 33–42. 2013.
- MERLOT, S.; DE SANCHEZ GARCIA, L. A.; TORRE, V.; HANIKENNE, M. Physiology and molecular biology of trace element hyperaccumulation. In: Echevarria, G.; van der Ent, A.; Morel, J. L.; Baker, A. J. M. (eds.). **Agromining: farming for metals. Extracting unconventional resources using plants**. Cham, Switzerland: Springer, 2018, pp. 93–116.
- NAGAJYOTI, P.; LEE, K.; SREEKANTH, T. Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 8, p. 199–216. 2010.
- NEILSON, S.; RAJAKARUNA, N. Phytoremediation of agricultural soils: Using plants to clean metal-contaminated arable land. In Ansari, A. A.; Gill, S.S.; Gill, R.; Lanza, G.R.; Newman, L. (eds.). **Phytoremediation**, Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2015, pp. 159–168.

OUKARROUM, A.; MADIDI, S. E. L.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438-446. 2007.

REDILLAS, M.C.F.R., STRASSER, R.J., JEONG, J.S., KIM, Y.S., KIM, J.K.: The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. **Plant Biotechnology Report**, v. 5, p.169-175. 2011.

ROSENQVIST, E.; VAN KOOTEN, O. Chlorophyll fluorescence: a general description and nomenclature. In: DeEll, J.R.; Toivonen, P.M.A. (eds.), **Practical Applications of Chlorophyll Fluorescence in Plant Biology**. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2003, pp. 31-77.

SEPPANEN, M.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H. Selenium effects on oxidative stress in potato. **Plant Science**, v. 165, p. 311–319. 2003.

STIRBET, A.; GOVINDJEE. On the relation between the Kautsky effect (chlorophyll *a* fluorescence induction) and Photosystem II: Basics and applications of the OJIP fluorescence transient. **Journal of Photochemistry and PhotoBiology**, v. 104, p. 236-257. 2011.

STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, In: Papageogiou, G.; Govindjee. (eds.), **Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration**, Springer, Dordrecht, 2004, pp. 321-362.

STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; DANGRE, D.; RAI, M. Biophysical phenomics reveals functional building blocks of plants systems biology: a case study for the evaluation of the impact of Mycorrhization with *Piriformospora indica*, In: Varma, A.; Oelmüller, R. (eds.), **Advanced Techniques in Soil Microbiology**, Soil Biology, Berlin Heidelberg, 2007, pp. 319-341.

SRIVASTAVA, M.; MA, L.Q.; RATHINASABAPATHI, B.; SRIVASTAVA, P. Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Bioresource Technology**, v. 100 (3), p. 1115–1121. 2009.

TERRY, N.; ZAYED, A.; DE SOUZA, M.; TARUN, A. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 51, p. 401–432. 2000.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. *In vivo* assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants, In: Varma, A. (ed.), **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco- Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**, Springer, Dordrecht, 2008, pp. 679-703.

VALKAMA, E.; KIVIMAENPAA, M.; HARTIKAINEN, H.; WULFF, A. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and

ultrastructure in strawberry (*Fragaria ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 120, p. 267–278. 2003.

VAN HOEWYK, D. A tale of two toxicities: malformed selenoproteins and oxidative stress both contribute to selenium stress in plants. **Annals of Botany**, v. 112, p. 965–972. 2013.

VIEHWEGER, K. How plants cope with heavy metals. **Botanical Studies**, v. 55, p. 1–12. 2014.

VERBRUGGEN, N.; HERMANS, C.; SCHAT, H. Molecular mechanisms of metal hyperaccumulation in plants. **New Phytologist**, v. 181, p. 759–776. 2009.

WANG, Q. Y.; ZHANG, J.; ZHAO, B. Z.; XIN, X. L.; DENG, X. H.; ZHANG, H. Influence of longterm fertilization on selenium accumulation in soil and uptake by crops. **Pedosphere**, v. 26 (1), p. 120–129. 2016.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428–1438. 2010.

ZHANG, L.; ACKLEY, A. R.; PILON-SMITS, E. A. H. Variation in selenium tolerance and accumulation among *Arabidopsis thaliana* accessions. **Plant Physiology**, v. 164, p. 327–336. 2007.

ZUBEK, S., TURNAU, K., TSIMILLI-MICHAEL, M., STRASSER, R. J. Response of endangered plant species to inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi and soil bacteria. **Mycorrhiza**, v. 19, p. 113–123. 2009.

2. Capítulo I: Selênio melhora dinâmica de transporte e conservação de energia no aparato fotossintético de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) *in vitro*.

Resumo

*Apesar dos efeitos benéficos, o selênio não é um elemento essencial para as plantas e seus mecanismos de ação ainda não estão claros. Neste contexto, propomos avaliar o efeito selênio, considerando as possíveis modulações do aparato fotossintético de Billbergia zebrina *in vitro*. Para isso, brotos laterais de Billbergia zebrina (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) foram cultivados em meio MS com diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). Após 75 dias, avaliou-se a concentração de pigmentos fotossintéticos, produção de biomassa e fluorescência da clorofila *a*. Este estudo demonstrou que, sob a concentração de 4 μM , o selênio aumenta capacidade potencial de conservação de energia do aparato fotossintético, mantém as reações de transporte de energia do FSII e melhora a dinâmica de transporte de elétrons entre o intersistema e o FSI. Ainda assim, observamos que *B. zebrina* não tolera concentrações iguais ou superiores a 16 μM de selênio, apresentando reduções no crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e danos ao aparato fotossintético.*

Palavras-chave: bromélia, fluorescência da clorofila *a*, aparato fotossintético, cultivo *in vitro*, fisiologia vegetal.

Abstract

Despite the beneficial effects, selenium is not an essential element for plants and their action mechanisms are still unclear. In this context we propose to evaluate the selenium effect, considering the possible modulations on Billbergia zebrina photosynthetic apparatus in vitro. For this, B. zebrina lateral shoots were grown in MS medium with different concentrations of selenium (0, 2, 4 and 16 μM). After 75 days the photosynthetic pigments concentration, growth traits and chlorophyll a fluorescence were evaluated. This study demonstrated that in low concentrations, selenium increases the photosynthetic apparatus potential energy conservation capacity, maintains the FSII energy transport reactions stability and improves the electron transport dynamics between the intersystem and the FSI. Still, we observed that B. zebrina does not tolerate concentrations equal to or greater than 16 μM of selenium, presenting reductions in growth, photosynthetic pigments content and photosynthetic apparatus impairment.

Keywords: bromeliad, chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic apparatus, *in vitro* culture, plant physiology.

Lista de tabelas

Tabela 1: Termos usados no teste JIP obtidos a partir do transiente de fluorescência da clorofila *a* (O-J-I-P) de acordo com Strasser *et al.*, (2004), Yusuf *et al.*, (2010); Goltstev *et al.*, (2016).....25

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de selênio (Se) (0, 2, 4 and 16 μ M) sobre o conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Diferentes letras referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com teste de Scott-Knott test a 5% de significância.....26

Lista de figuras

Figura 1: Efeito de diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM) sobre o crescimento de plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Diferentes letras referem-se as diferenças entre tratamentos para a produção de biomassa de raízes ou parte aérea de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de significância..... 26

Figura 2: Efeitos de diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 and 16 μM) sobre: (A) a curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila *a*; (B) pontos do transiente OJIP (O = 0,02 ms, K = 0,3 ms, J = 2 ms, I = 30 ms e P = 300 ms); (C) fluorescência relativa entre os pontos 0,02 e 300 ms ou $V_t = (F_t - F_0) / (F_M - F_0)$ e (D) Diferença cinética entre os pontos O (0,02 ms) e P (300 ms) ou ΔV_t estabelecidas entre 0,01 e 300 ms a partir da normalização $\Delta V_t = [V_{t(\text{controle})} - V_{t(\text{tratamento})}]$, em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Diferentes letras na figura 2B se refere às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 28

Figura 3: (A) Variação da banda L (0,15 ms) ou ΔV_{OK} estabelecidas entre 0 e 0,3 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OK} = [V_{OK(\text{controle})} - V_{OK(\text{tratamento})}]$, onde $V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$ e (B) variação da banda K (0,3 ms) ou ΔV_{OJ} estabelecida entre 0 e 2 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OJ} = [V_{OJ(\text{controle})} - V_{OJ(\text{tratamento})}]$, onde $V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM)..... 29

Figura 4: (A) Normalização entre F_0 e F_I onde $V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$, sendo $V_{OI} \geq 1$ no intervalo de 30 a 300 ms, (B) normalização entre F_I e F_P onde $V_{IP} = (F_t - F_I) / (F_P - F_I)$ no intervalo de 30 a 300 ms e $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$ e (C) fluorescência relativa variável entre os pontos I-P ou $\Delta V_{IP} = (V_{IP(\text{controle})} - V_{IP(\text{tratamento})})$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). Letras distintas mostradas no gráfico de ΔV_{IP} referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 29

Figura 5: Parâmetros fotoquímicos derivados da análise do teste JIP em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). As colunas (escala da ordenada principal à esquerda) referem-se aos parâmetros de fluxo específico de energia por centro de reação: fluxo de absorção de energia (ABS/RC), energia capturada (TR_0/RC), transporte de elétrons (ET_0/RC), dissipação como calor (DI_0/RC) e redução dos aceptores finais do FSI (RE_0/RC). A linha (escala da ordenada secundária à direita) refere-se à fração de centros de reação redutores de Q_A por clorofila no complexo antena do FSII (RC/ABS). Para todos os parâmetros as letras distintas referem-se às diferenças encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 30

Figura 6: (A) Parâmetros fotoquímicos derivados da análise do teste JIP em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). As colunas (escala da ordenada principal à esquerda) referem-se à razão dos fluxos de energia que caracterizam o rendimento quântico para: a fotoquímica primária (ϕP_0), dissipação de calor (ϕD_0), conversão da energia de excitação para o transporte de elétrons (ϕE_0), redução dos aceptores finais do FSI (ϕR_0). As linhas (escala da ordenada secundária à direita) representam os valores normalizados de acordo com o controle (0 μM) e referem-se às probabilidades de: um éxciton capturado mover-se para além da Q_A^- (ψE_0) e um elétron do intersistema mover-se

para o lado acceptor do FSI (δRo). O duplo asterisco (**) representa diferença entre os tratamentos com selênio em relação ao controle de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância. (B) Efeito de diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM) sobre o índice de desempenho (potencial) para conservação de energia desde éxcitons capturados até a redução dos aceptores de elétrons do intersistema e (C) índice de desempenho (potencial) para conservação de energia de um éxciton capturado para redução dos aceptores finais do FSI. Em todos gráficos, letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 31

2.1. Introdução

O selênio (Se) não é um elemento essencial para as plantas, mas apresenta efeito benéfico em baixas concentrações (PILON-SMITH *et al.*, 2009). Vários estudos demonstraram diferentes ações do selênio na fisiologia das plantas, tais como: aumento da biomassa (CHEN *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2015; FENG *et al.*, 2016), retardamento da senescência (XUE *et al.*, 2001; DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2004), tolerância a danos oxidativos (FENG *et al.*, 2013; DIAO *et al.*, 2014; QING *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2015) incremento de pigmentos de carotenóides (NING *et al.*, 2016) que melhoram a tolerância ao estresse foto-oxidativo (SEPPÄNEN *et al.*, 2003; CARTES *et al.*, 2010), acumulação de carboidratos (TURAKAINEN *et al.*, 2006; OWUSU-SEKYERE *et al.*, 2013) e amenização dos efeitos de estresses abióticos e bióticos (HANSON *et al.*, 2003; FILEK *et al.*, 2008; YAO *et al.*, 2010; HASANUZZAMAN e FUJIT, 2011; HAN *et al.*, 2015)

As plantas variam substancialmente em sua resposta fisiológica ao Se (TERRY *et al.*, 2000) e seus possíveis mecanismos de ação não estão totalmente esclarecidos (FENG *et al.*, 2012). Nesse âmbito, incrementos fisiológicos causados pelo Se em plantas podem ser atribuídos a vários mecanismos diferentes como diminuição de espécies reativas de oxigênio (ERO's), aumento da produção de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, reestruturação de cloroplastos danificados e maior produção de metabolitos vitais (BACHIEGA *et al.*, 2016; TIAN *et al.*, 2016).

A deficiência e a toxicidade de Se existem em todo o mundo, dependendo da sua disponibilidade no ambiente (ZHANG *et al.*, 2007). Do ponto de vista ecotoxicológico, existe um intervalo de concentração estreito para que um elemento passe de um componente benéfico a um tóxico (PILON-SMITS e LEDUC 2009; ZHU *et al.*, 2009). Mesmo uma contaminação de baixo nível, se presente numa escala suficientemente grande, pode representar prejuízos ao ambiente (LINDBLOM *et al.*, 2012). Dessa forma, a poluição ambiental pelo Se pode ter um impacto sobre saúde humana, produtividade agrícola e estabilidade de ecossistemas naturais.

Níveis mais elevados de Se podem danificar o aparato fotossintético, inibir a fotossíntese e resultar na baixa produção de amido (VITOVA *et al.*, 2011; ŁABANOWSKA *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2012). Todavia, em concentrações adequadas, o selênio pode causar incrementos na fotossíntese e proteção do fotossistema II (FSII) (FENG *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2015). Pesquisas anteriores reportaram que a técnica da fluorescência da clorofila *a* é um meio não-destrutivo e eficiente para avaliar modulações do aparato fotossintético frente a diferentes

condições ambientais (GUO *et al.*, 2012; ZUSHI *et al.*, 2012). Neste estudo a bromélia *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley foi o material vegetal utilizado no cultivo *in vitro*. A técnica de cultura *in vitro* é vantajosa porque permite isolar o efeito do selênio no metabolismo da planta em relação aos efeitos de outros estresses (MARTINS *et al.*, 2016). Neste contexto, o objetivo deste estudo foi de avaliar o efeito do selênio sobre o desempenho fotossintético de *B. zebrina* (Bromeliaceae) *in vitro*, considerando as possíveis modulações (melhora, dano e/ou sítio de ação) do aparato fotossintético e assim, contribuir para um maior esclarecimento da ação do selênio nas plantas.

2.2. Material e métodos

2.2.1. Exposição de material vegetal ao selênio durante o crescimento *in vitro*

Broto laterais de *B. zebrina*, obtidos de plantas previamente estabelecidas *in vitro*, foram individualizados com auxílio de bisturi e transferidos para potes de vidro de 268 mL contendo 50 ml de meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado e 3,5 g L⁻¹ de ágar. O selênio foi adicionado aos meios nas seguintes concentrações em escala exponencial: 0, 2, 4 e 16 µM. O selenito de sódio (Na₂SeO₃) foi usado como fonte de selênio, sendo apenas considerado o peso molecular do selênio para os cálculos de concentração. O pH do meio de cultivo foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C durante 20 minutos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento por 75 dias à temperatura de 25 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

2.2.2. Análise de crescimento

Para avaliar o crescimento das plantas *in vitro*, cinquenta plantas de cada tratamento foram coletadas aleatoriamente, divididas em dez parcelas e pesadas em balança de precisão. Assim, foram determinadas em gramas (g), a massa fresca (MF) das raízes e da parte aérea separadamente.

2.2.3. Análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos

Para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram utilizadas 30 mg de material vegetal extraído da terceira folha totalmente expandida contada a partir do centro da roseta em 12 amostras selecionadas aleatoriamente. O material vegetal foi acondicionado em tubos de ensaio contendo 5 ml de acetona 80% e mantido no escuro sob temperatura de 4°C por 48 horas para posterior análise espectrofotométrica (VICTÓRIO *et al.*, 2007). As leituras foram feitas a $\lambda = 480$, $\lambda = 645$, $\lambda = 665$ nm para carotenóides, clorofila *a* e clorofila *b*, respectivamente. Os teores

dos pigmentos fotossintéticos, expressos em $\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$, foram calculados de acordo com as equações de Arnon (1949) e Lichtenthaler (1987), conforme segue: $\text{Chl. } a = [(12, 7.A663).(2, 69.A645)/(1000.FW).V]$, $\text{Clor } b = [(22,9.A645).(4, 68.A663) /1000.FW).V]$, $\text{Clor. total} = [(20, 2.A663).(2, 69.A645)/(1000.FW).V]$ e $\text{Carotenóides} = [(1000.A470-1,82.Clor.a-85,02.Clor.b)/(198.V)]$.

2.2.4. *Análise da fluorescência da clorofila a*

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida após 75 dias de cultivo sob os tratamentos com selênio. As medidas foram feitas em 15 plantas por tratamento sempre na terceira folha totalmente expandida contada a partir do centro da roseta. As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos utilizando cliques foliares (Hanstech) para a oxidação completa do sistema fotossintético. Os transientes foram induzidos com 1s de iluminação por um pulso de luz saturante com intensidade máxima de $3000 \mu\text{mol (fótons) m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em uma área foliar de 4 mm de diâmetro utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). A emissão de fluorescência transiente foi, então, registrada de 10 ms a 1 s com 120 pontos de fluorescência. A partir da curva de fluorescência transiente OJIP, o teste JIP foi avaliado com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER e STRASSER, 1995; STRASSER *et al.*, 2004) considerando-se os parâmetros citados na Tabela 1.

Tabela 1. Termos usados no teste JIP obtidos a partir do transiente de fluorescência da clorofila *a* (O-J-I-P) de acordo com Strasser *et al.*, (2004), Yusuf *et al.*, (2010); Goltsev *et al.*, (2016).

Parâmetros de fluorescência	Descrição
Dados extraídos do transiente de fluorescência OJIP	
$F_{20\mu s}$	Fluorescência mínima
$F_K = F_{0,3ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto K aos 300 μs do transiente OJIP
$F_J = F_{2ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto J aos 2 ms do transiente OJIP
$F_I = F_{30ms}$	Intensidade da fluorescência no ponto I aos 30 ms do transiente OJIP
$F_P = F_{300ms}$	Intensidade máxima da fluorescência no ponto P aos 300 ms do transiente OJIP
Parâmetros técnicos	
$F_O = F_{0,02ms}$	Fluorescência inicial
F_M	Fluorescência máxima
$F_V = F_M - F_O$	Fluorescência variável
$M_0 = dV/dt_0 = [4 (F_{300\mu s} - F_O)/(F_M - F_O)]$	Origem da inclinação da curva de fluorescência [= taxa relativa de redução de Q_A (dQ_A^- / dt_0 por $Q_{A\ Total}$)]
$V_J = (F_{2ms} - F_O)/(F_M - F_O)$	Fluorescência variável normalizada no ponto J (2 ms)
$V_I = (F_{30ms} - F_O)/(F_M - F_O)$	Fluorescência variável normalizada no ponto I (30 ms)
Rendimento quântico e eficiências	
$\phi P_0 = TR_0/ABS = (F_M - F_O)/F_M = 1 - (F_O/F_M)$	Rendimento quântico fotoquímico máximo para fotoquímica primária
$\psi E_0 = ET_0/TR_0 = 1 - V_J$	Probabilidade de um éxciton capturado de se mover para além de Q_A^-
$\phi E_0 = \phi P_0 \psi E_0 = (TR_0/ABS)(ET_0/TR_0) = ET_0/ABS = (1 - F_O/F_M)(1 - V_J)$	Probabilidade de um fóton absorvido tem de se mover além de Q_A^-
$\phi D_0 = DI_0/ABS = 1 - \phi P_0 = F_O/F_M$	Rendimento quântico fotoquímico para dissipação de calor
$\delta R_0 = RE_0/ET_0 = (1 - V_I)/(1 - V_J)$	Eficiência/ Probabilidade que um elétron do intersistema mover-se para o lado acceptor do FSI
$\phi R_0 = RE_0/ABS = \phi P_0 \psi E_0 \delta R_0$	Rendimento quântico para redução dos aceptores finais do FSI por fóton absorvido
$RC/ABS = (RC/TR_0)(TR_0/ABS) = (V_J/M_0) (F_V/F_M)$	Centros e reação redutores de Q_A por clorofila na antena do FSII
Fluxos específicos de energia (por Q_A reduzindo centro de reação do FSII)	
$ABS/RC = M_0/V_J/\phi P_0$	Fluxo de absorção por centro de reação ativo
$TR_0/RC = M_0/V_J$	Fluxo de energia capturada por centro de reação ativo
$ET_0/RC = (M_0/V_J)\psi E_0 = (M_0/V_J)(1 - V_J)$	Fluxo de elétrons transportados por centro de reação ativo
$DI_0/RC = [(ABS/RC) - (TR_0/RC)]$	Energia total dissipada como calor por centro de reação,
$RE_0/RC = M_0 (1/V_J) \psi E_0 \delta R_0$	Redução de aceptores finais do lado acceptor do FSI por centro de reação
Índices de desempenho	
$PI_{ABS} = RC/ABS [\phi P_0/(1 - \phi P_0)]$ $[\psi E_0/(1 - \psi E_0)]$	Índice de desempenho (potencial) para conservação de energia desde éxcitons capturados até a redução dos aceptores de elétrons do intersistema
$PI_{Total} = PI_{ABS} [\delta R_0/(1 - \delta R_0)]$	Índice de desempenho (potencial) para conservação de energia de um éxciton capturado para redução dos aceptores finais do FSI

2.2.5. Análise estatística

O desenho amostral foi inteiramente casualizado (DIC). Os parâmetros do JIP-test, pigmentos fotossintéticos e produção de biomassa foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas usando o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para isso foi utilizado o software SISVAR.

2.3. Resultados

Reduções significativas do acúmulo de biomassa fresca de raízes e parte aérea foram observadas nas amostras tratadas com 16 μM Se, sem efeitos significativos para os demais tratamentos (Figura 1).

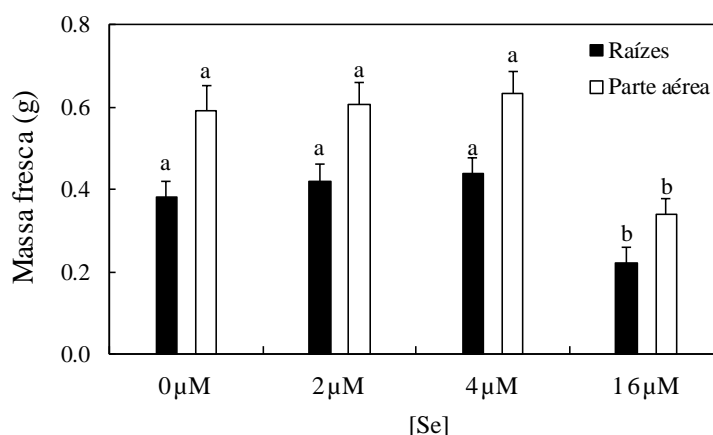


Figura 1: Efeito de diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM) sobre o crescimento de plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Diferentes letras referem-se às diferenças entre tratamentos para a produção de biomassa de raízes ou parte aérea de acordo com o teste de Scott-Knott com 5% de significância.

Similarmente, a concentração de Clorofila *a* (Clr. *a*) e Clorofila *total* (Clr. *total*) diminuiu sob 16 μM Se sem nenhuma alteração na concentração de clorofila *b* (Clr. *b*) entre as doses de Se testadas (Tabela 2). Porém, um incremento na concentração de pigmentos carotenoides foi observado nas plantas cultivadas com 2 μM Se (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito de diferentes concentrações de selênio (Se) (0, 2, 4 and 16 μM) sobre o conteúdo de pigmentos fotossintéticos de plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Diferentes letras referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com teste de Scott-Knott test a 5% de significância.

[Se]	Pigmentos fotossintéticos ($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1} \text{MF}$)			
	Clr. <i>a</i>	Clr. <i>b</i>	Clr. <i>total</i>	Carot.
0 μM	1.11 ± 0.06 a	0.42 ± 0.04 a	1.83 ± 0.10 a	0.60 ± 0.03 b
2 μM	1.06 ± 0.06 a	0.48 ± 0.02 a	1.75 ± 0.09 a	0.70 ± 0.03 a
4 μM	1.09 ± 0.03 a	0.44 ± 0.01 a	1.79 ± 0.05 a	0.61 ± 0.03 b
16 μM	0.91 ± 0.05 b	0.38 ± 0.02 a	1.49 ± 0.08 b	0.54 ± 0.02 b

As amostras de *B. zebrina*, quando submetidas aos tratamentos com selênio *in vitro*, mantiveram-se fotossinteticamente ativas, visto que apresentaram curvas OJIP com aumento polifásico característico (Figura 2A). Relativo ao controle, houve diminuição da fluorescência inicial (F_0 ou $O = 0,02$ ms) e da fluorescência obtida aos 0,3 ms (F_K) nas amostras cultivadas sob 2 μM e 4 μM Se. Em contrapartida, maiores valores de F_0 e F_K foram obtidos para as amostras crescendo sob 16 μM (Figura 2A). Supressões dos sinais de fluorescência obtidos aos 2 ms e 300 ms (F_J e F_P , respectivamente) ocorreram em todos os tratamentos com selênio, assim como para o ponto I (obtido aos 30 ms). Entretanto, maior supressão do ponto I foi observada nas amostras tratadas com 4 μM e 16 μM Se (Figura 2B).

Aumentos em V_J foram observados nas amostras tratadas com 16 μM Se seguidos de supressões em V_I nas amostras crescendo sob 04 μM e 16 μM Se (Figura 2C). Utilizando das normalizações relativas ao ΔV_t , estabelecidas entre 0,02 e 300 ms, observou-se desvio positivo para as amostras cultivadas sob 16 μM Se aos 2ms, enquanto que para aquelas tratadas com 2 μM e 4 μM Se nenhum desvio foi observado (Figura 2D). Todavia, nas fases subsequentes compreendidas entre os pontos J e P, diferenças negativas foram obtidas aos 30 ms (banda I) para os tratamentos de 4 μM e 16 μM Se (Figura 2D).

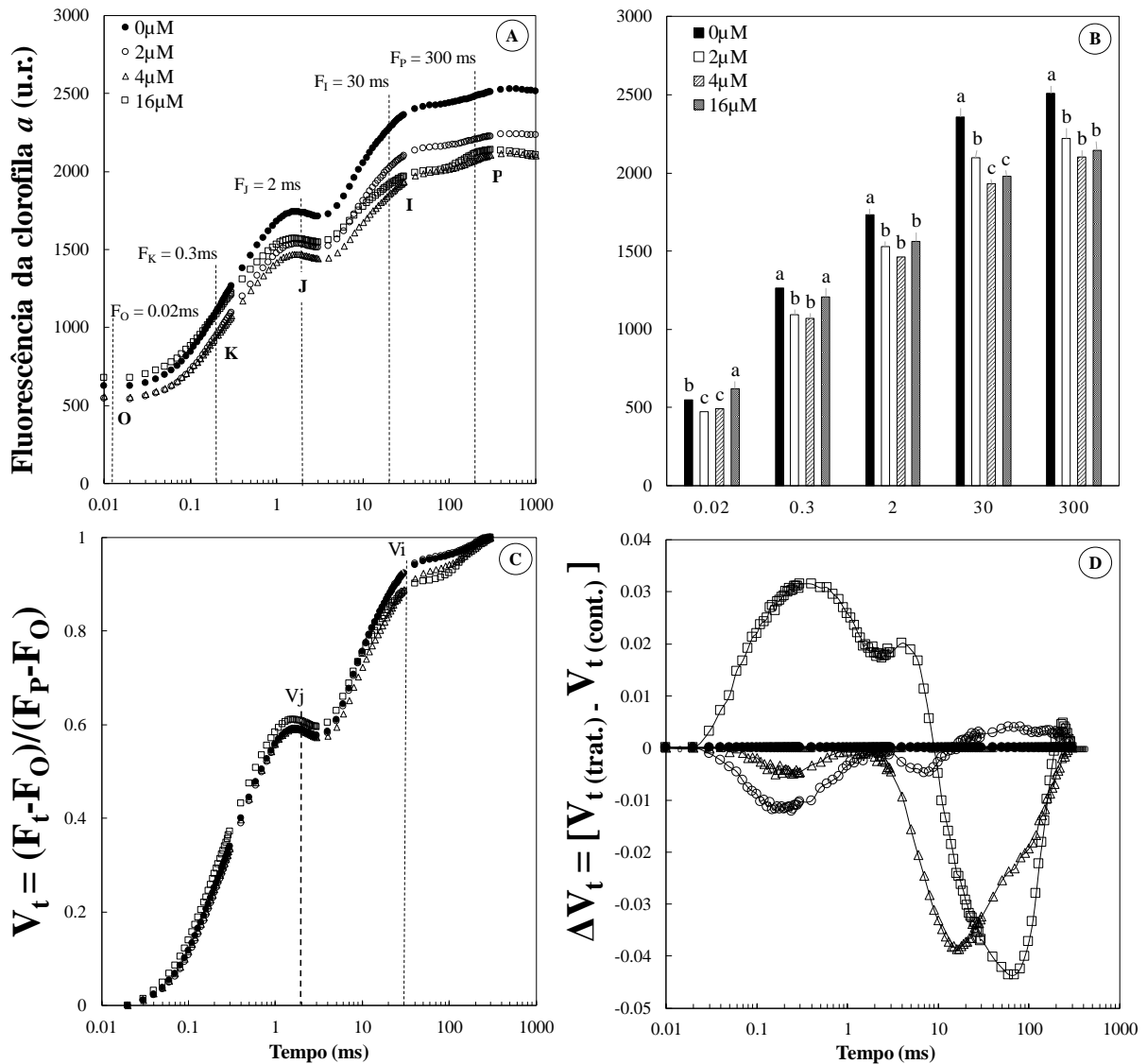


Figura 2: Efeitos de diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 and 16 μM) sobre: (A) a curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila *a*; (B) pontos do transiente OJIP (O = 0,02 ms, K = 0,3 ms, J = 2 ms, I = 30 ms e P = 300 ms); (C) fluorescência relativa entre os pontos 0,02 e 300 ms ou $V_t = (F_t - F_O) / (F_P - F_O)$ e (D) Diferença cinética entre os pontos O (0,02 ms) e P (300 ms) ou ΔV_t estabelecidas entre 0,01 e 300 ms a partir da normalização $\Delta V_t = [V_t (\text{controle}) - V_t (\text{tratamento})]$, em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Diferentes letras na figura 2B se refere às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Diferenças negativas foram observadas para as bandas L e K (ΔV_{OK} e ΔV_{OJ} estabelecidos entre 0-0,3 e 0-2 ms, respectivamente) nas amostras cultivadas sob 2 μM e 4 μM Se, sendo mais expressivos (maior amplitude negativa) naquelas sob a menor concentração (Figura 3A). Ao contrário, as amostras cultivadas sob 16 μM Se apresentaram bandas L e K com diferenças positivas (+0.026 e +0.061, respectivamente) comparativamente ao controle (Figura 3A - B).

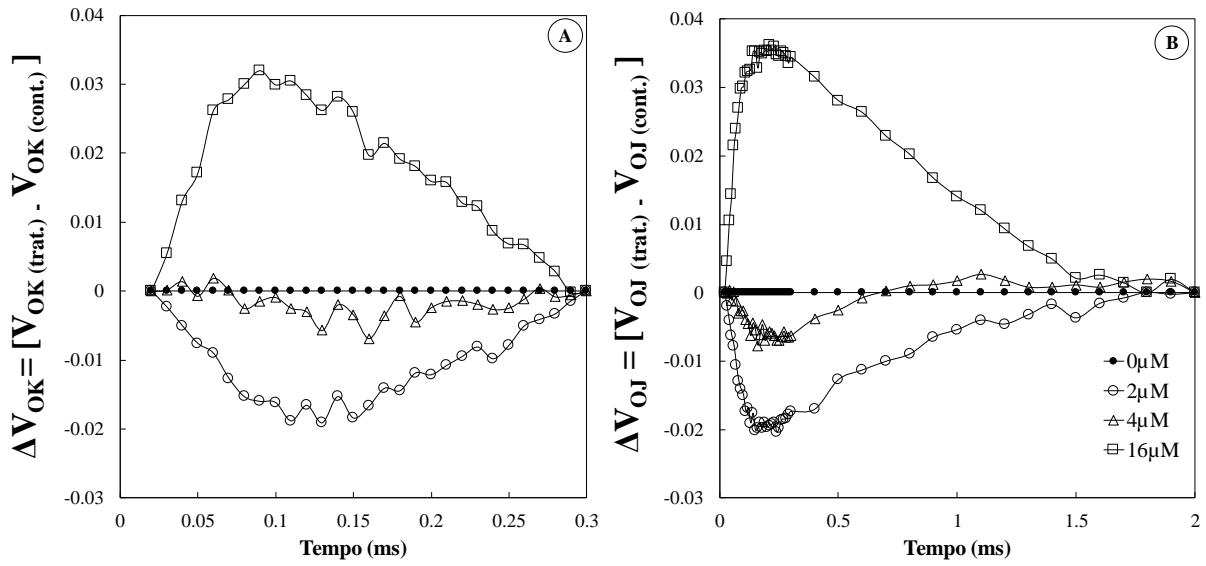


Figura 3: (A) Variação da banda L (0,15 ms) ou ΔV_{OK} estabelecidas entre 0 e 0,3 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OK} = [V_{OK}(\text{controle}) - V_{OK}(\text{tratamento})]$, onde $V_{OK} = (F_t - F_o) / (F_K - F_o)$ e (B) variação da banda K (0,3 ms) ou ΔV_{OJ} estabelecida entre 0 e 2 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OJ} = [V_{OJ}(\text{controle}) - V_{OJ}(\text{tratamento})]$, onde $V_{OJ} = (F_t - F_o) / (F_J - F_o)$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM).

As curvas de maior amplitude observadas para a fluorescência relativa referente a $V_{OI} \geq 1$, obtida no intervalo de 30 a 300 ms, foram observadas para 4 μM e 16 μM Se (Figura 4A), assim como o maior tempo para atingir 0.5 na ordenada V_{IP} estabelecida no mesmo intervalo de tempo, porém considerando-se F_I e F_P (Figura 4B). O $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_o)$ aumentou gradualmente nas amostras cultivadas sob 4 μM e 16 μM Se (Figura 4B). As curvas referentes à fluorescência relativa variável entre os pontos I-P ou $\Delta V_{IP} = (V_{IP}(\text{controle}) - V_{IP}(\text{tratamento}))$ foram negativas em relação ao controle nos tratamentos 4 μM e 16 μM Se (Figura 4C).

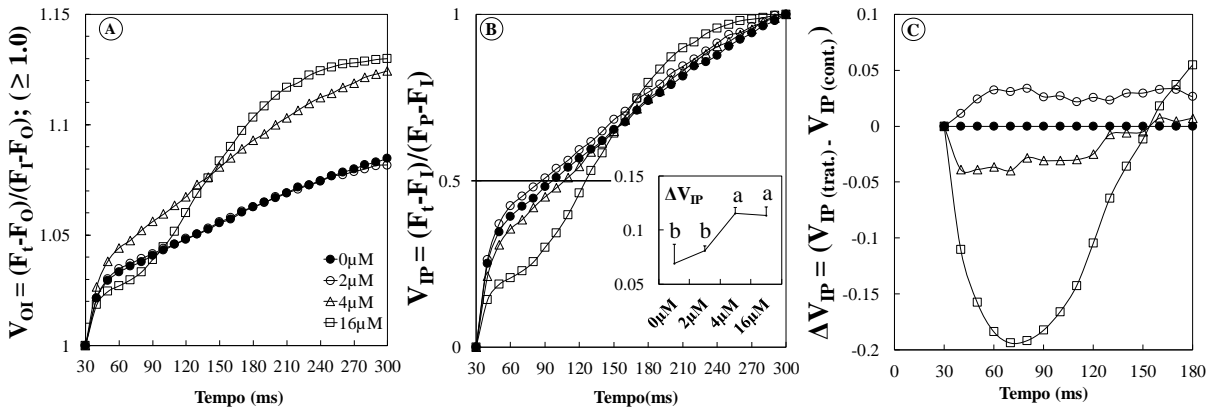


Figura 4: (A) Normalização entre F_o e F_I onde $V_{OI} = (F_t - F_o) / (F_I - F_o)$, sendo $V_{OI} \geq 1$ no intervalo de 30 a 300 ms, (B) normalização entre F_I e F_P onde $V_{IP} = (F_t - F_I) / (F_P - F_I)$ no intervalo de 30 a 300 ms e $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_o)$ e (C) fluorescência relativa variável entre os pontos I-P ou $\Delta V_{IP} = (V_{IP}(\text{controle}) - V_{IP}(\text{tratamento}))$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). Letras distintas mostradas no gráfico de ΔV_{IP} referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os parâmetros de fluxo específico de energia extraídos do teste JIP evidenciaram reduções em RC/ABS nas amostras sob 16 μM Se. Consequentemente, os valores de ABS/RC foram maiores diferindo-se significativamente dos demais tratamentos. Similarmente, sob 16 μM Se, maiores valores de TR_0/RC e DI_0/RC foram observados. Nenhuma diferença em ET_0/RC foi registrada entre os tratamentos, enquanto que RE_0/RC aumentou significativamente nas amostras cultivadas com 4 μM e 16 μM Se (Figura 5).

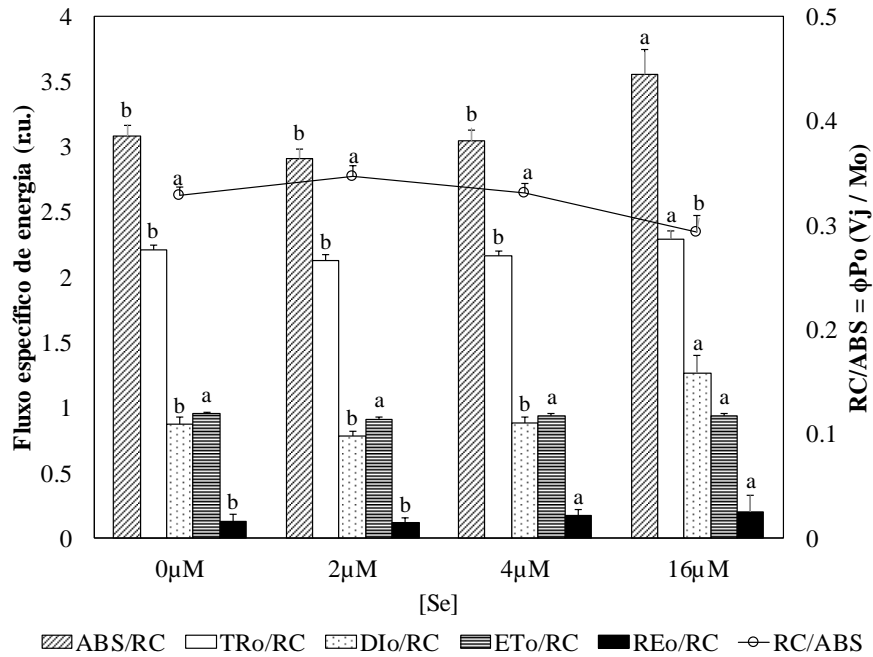


Figura 5: Parâmetros fotoquímicos derivados da análise do teste JIP em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). As colunas (escala da ordenada principal à esquerda) referem-se aos parâmetros de fluxo específico de energia por centro de reação: fluxo de absorção de energia (ABS/RC), energia capturada (TR_0/RC), transporte de elétrons (ET_0/RC), dissipação como calor (DI_0/RC) e redução dos aceptores finais do FSI (RE_0/RC). A linha (escala da ordenada secundária à direita) refere-se à fração de centros de reação redutores de Q_A por clorofila no complexo antena do FSII (RC/ABS). Para todos os parâmetros as letras distintas referem-se às diferenças encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

O $\phi P_0 = \text{TR}_0/\text{ABS}$ foi maior e equivalente entre 0 μM , 2 μM e 4 μM Se, diferindo-se do tratamento utilizando 16 μM Se. Assim, sob 16 μM Se, maiores valores de $\phi D_0 = \text{DI}_0/\text{ABS}$ foram observados, uma vez que estes são parâmetros inversamente proporcionais (Figura 6A). Ao contrário, o menor valor de $\phi E_0 = \text{ET}_0/\text{ABS}$ foi observado nas amostras cultivadas sob 16 μM . Para $\psi E_0 = \text{ET}_0/\text{TR}_0$, nenhuma diferença foi observada entre as doses de Se testadas. Maiores valores de $\phi R_0 = \text{RE}_0/\text{ABS}$, $\delta R_0 = \text{RE}_0/\text{ET}_0$ e $\rho R_0 = \text{RE}_0/\text{TR}_0$ foram observados para os tratamentos 4 μM e 16 μM Se (Figura 6A). Maiores valores de PI_{ABS} foram observados para 0 μM , 2 μM e 4 μM Se (Figura 6B), diferindo-se daqueles obtidos para 16 μM . Para PI_{Total} , o maior índice foi observado para 4 μM (Figura 6C).

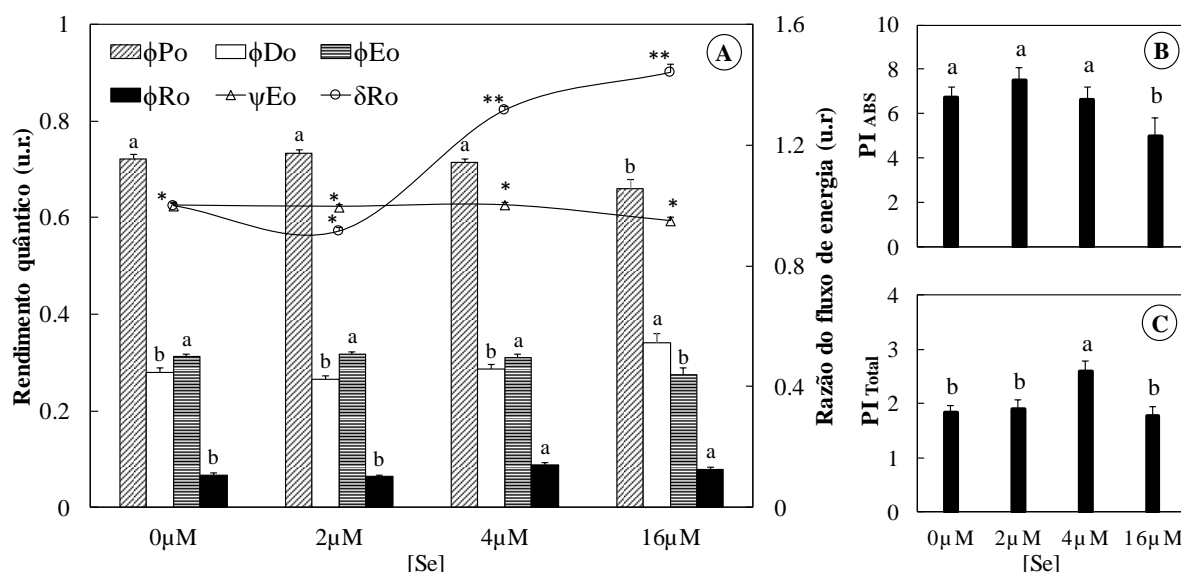


Figura 6: (A) Parâmetros fotoquímicos derivados da análise do teste JIP em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM). As colunas (escala da ordenada principal à esquerda) referem-se à razão dos fluxos de energia que caracterizam o rendimento quântico para: a fotoquímica primária (φP₀), dissipação de calor (φD₀), conversão da energia de excitação para o transporte de elétrons (φE₀), redução dos aceptores finais do FSI (φR₀). As linhas (escala da ordenada secundária à direita) representam os valores normalizados de acordo com o controle (0 μM) e referem-se às probabilidades de: um éxciton capturado mover-se para além da Q_A⁻ (ψE₀) e um elétron do intersistema mover-se para o lado aceptor do FSI (δR₀). O duplo asterisco (**) representa diferença entre os tratamentos com selênio em relação ao controle de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância. (B) Efeito de diferentes concentrações de selênio (0, 2, 4 e 16 μM) sobre o índice de desempenho (potencial) para conservação de energia desde éxcitons capturados até a redução dos aceptores de elétrons do intersistema e (C) índice de desempenho (potencial) para conservação de energia de um éxciton capturado para redução dos aceptores finais do FSI. Em todos gráficos, letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

2.4. Discussão

As amostras que cresceram sob os tratamentos com 0 μM, 2 μM e 4 μM Se não apresentaram diferenças na produção de biomassa (Fig. 1). Para algumas espécies como alfafa (BROYER *et al.*, 1966), azevém (HARTIKAINEN *et al.*, 1997) e sorgo (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2010), baixas concentrações de Se também não produziram efeitos sobre o crescimento das plantas. No entanto, a capacidade do Se em promover o crescimento foram relatados em alface (XUE *et al.*, 2001) e soja (DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2005), embora, em geral, esses estudos mostraram que altas concentrações de Se reduz o crescimento, assim como observado para as amostras de *B. Zebrina* cultivadas sob 16 μM Se (Fig 1). De acordo com Hartikainen *et al.*, (2000) e Djanaguiraman *et al.*, (2005), os efeitos do Se sobre o crescimento das plantas podem ser atribuídos, principalmente, à função antioxidante do selênio, mediada principalmente por selenoproteínas como as glutathione peroxidases. Esses compostos catalisam a redução de

hidroperóxidos à custa da glutathione, protegendo contra danos oxidativos (STADTMAN *et al.*, 1996; KRYUKOV *et al.*, 2003).

A quantificação dos pigmentos fotossintéticos em tecidos de plantas sob diferentes condições ambientais pode representar uma importante ferramenta de avaliação ecofisiológica (LAMBERS *et al.*, 2008). Os pigmentos fotossintéticos controlam a quantidade de radiação solar que é absorvida pelas plantas e outros organismos fotossintetizantes. Isso os tornam intimamente associados às taxas fotossintéticas e à produtividade primária na fase fotoquímica da fotossíntese (BLACKBURN *et al.*, 2007). As amostras de *B. zebrina* cultivadas sob 2 μ M e 4 μ M, muito embora não variaram nos níveis de pigmentos fotossintéticos (Tab. 2), apresentaram modulações no aparato fotossintético quando comparadas ao controle. Contudo, o aumento da concentração de pigmentos carotenoides nas amostras tratadas com 2 μ M Se foi uma exceção. Antioxidantes não enzimáticos, como os carotenoides, tem papel importante na resposta celular ao estresse oxidativo reduzindo ERO's (MAGER e DE-KRUIJFF, 1995). Os pigmentos carotenoides, através do ciclo das xantofilas, atuam no processo de proteção das plantas contra estresses ambientais. A degradação do β -caroteno dá início ao ciclo das xantofilas, ocasionando um eficiente mecanismo de dissipação da energia quando o aparato fotossintético está saturado energeticamente (FRANK *et al.*, 1999; LAMBERS *et al.*, 2008). A relação entre o Se e a síntese de carotenoides ainda não está esclarecida. Estudos anteriores reportaram tanto incrementos (DONG *et al.*, 2012; ZHONG *et al.*, 2014; NING *et al.*, 2016) quanto decréscimos (MECHORA *et al.*, 2013; LEHOTAI *et al.*, 2016) na concentração de carotenoides em plantas submetidas a doses de Se. Nas amostras mantidas sob 16 μ M Se houve decréscimos nas concentrações de Clr. *total* (Tab. 2). Nesse contexto, essas plantas poderiam sofrer um efeito fotodestrutivo causado pela elevação das taxas de degradação e redução das taxas de biossíntese desses pigmentos (TAUSZ *et al.*, 2001), possivelmente em função do efeito tóxico da alta concentração de selênio (ZHONG *et al.*, 2014).

O aumento da magnitude dos sinais de fluorescência desde um nível basal (F_0) até um nível máximo (F_M) com pontos intermediários J e I bem definidos indicam que as amostras estavam fotossinteticamente ativas em todos os tratamentos (MEHTA *et al.*, 2010; YUSUF *et al.*, 2010) (Fig 2A). A supressão em todos os pontos de referência do transiente OJIP (0.02, 0.3, 2, 30 e 300 ms) sob 2 μ M e 4 μ M Se (Fig. 2B) podem ser um indicativo de maior destinação de energia para o quenching fotoquímico (MÜLLER *et al.*, 2001), visto que não houve diferenças para a dissipação de calor (DI_0/RC) para esses tratamentos (Fig. 5).

Neste estudo, o aumento de V_J observado nas plantas cultivadas sob 16 μM Se (Fig. 2C) é um indicativo do acúmulo de quinona A reduzida (Q_A^-), o qual implica na desaceleração da transferência de elétrons para o segundo aceptor da cadeia de transporte de elétrons, quinona B (Q_B) (STRASSER *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2014). A diferença cinética (ΔV_i) que aparece aproximadamente aos 2 ms (Fig. 2D) é fortemente influenciada pelas reações redox dos aceptores iniciais, principalmente Q_A (KRUGER *et al.*, 2014; STRASSER *et al.*, 2010). Assim, um positiva, como aquela observada nas amostras cultivadas na presença de 16 μM Se, sugere que altas concentrações de Se comprometam a probabilidade de um elétron mover-se para o intersistema em direção ao FSI a partir da Q_A^- (STRASSER *et al.*, 2000). Por outro lado, nas amostras de *B. Zebrina* cultivadas nos demais tratamentos com Se, não houve diferenças em relação ao controle (Fig. 2D). Essa condição pode indicar estabilidade na doação de elétrons da água em função de um incremento ou manutenção da atividade do FSI como observado por Kruger *et al.*, (2014) em estudos com diferentes temperaturas. Ou ainda, segundo Christen *et al.*, (2007) em um estudo com videiras sob estresse abiótico e biótico, uma banda-J negativa sugere um aumento na capacidade de reoxidar o *pool* de quinonas.

De acordo com Oukarroum *et al.*, (2009), a análise das bandas-L e bandas-K são boas referências para caracterizar distúrbios fisiológicos em plantas. A banda-L, que aparece aproximadamente aos 0,15 ms, é um indicador da conectividade energética (agrupamento) das unidades do FSII (STRASSER *et al.*, 2004). Assim, uma banda-L positiva, como aquela observada nas amostras de *B. zebrina* cultivadas sob 16 μM Se (Fig. 3A) sugere que altas doses de Se desestabilizam a cooperatividade energética das unidades FSII (POLLASTRINI *et al.*, 2017). Esta pode estar associada ao desempilhamento das membranas dos tilacoides (OUKARROUM *et al.*, 2007). Todavia, as diferenças negativas observadas para os amostras submetidas a 2 μM e 4 μM Se indicam maior conectividade (Fig. 3A), o que resulta em melhor utilização da energia de excitação e maior estabilidade do sistema (STRASSER *et al.*, 2004).

A banda-K aparece aproximadamente aos 0,3 ms (ver Figura 3B) e expressa a atividade de doação de elétrons do complexo de evolução do oxigênio (CEO) para o FSII, que, por sua vez, compete com a doação de elétrons que não são provenientes da água (POLLASTRINI *et al.*, 2017). Uma banda-K positiva como aquela observada nas amostras sob 16 μM Se (Fig 3B) indica a falta de integridade do CEO desestabilizando a evolução do oxigênio pelo complexo manganês (Mn_4CaO_5) como doador de elétrons para o FSII (GURURANI *et al.*, 2012). Strasser *et al.* (2000) reportaram que alterações do CEO possibilitam que doadores de elétrons alternativos transfiram elétrons para o FSII criando um aumento de feofitina reduzida (Pheo^-) e

Q_A^- e, assim, desencadeiam uma banda-K positiva. Uma vez que o CEO oferece acesso a doadores de elétrons não provenientes da água como o ascorbato (TOTH *et al.*, 2011), prolina (DE RONDE *et al.*, 2004) ou qualquer outro doador interno que tenha um eletropotencial mais negativo do que o potencial de redução da reação H_2O/O_2 , seu mal funcionamento pode ser compensado por esses doadores por um curto período de tempo (GURURANI *et al.*, 2012). Valores positivos para a banda K podem indicar, ainda, um aumento no tamanho funcional da antena associada ao FSII (YUSUF *et al.*, 2010) bem como danos entre o lado doador e acceptor do FSII, resultante de um desbalanço entre o fluxo de elétrons do CEO para o centro de reação e lado acceptor do FSII em direção ao FSI (STRASSER, 1997; CHEN e CHENG, 2010). Uma banda-K negativa como aquelas observadas para as amostras sob 2 μM e 4 μM Se em relação ao controle (Fig. 3B) indicam um incremento no funcionamento do CEO e integridade do complexo manganês como descrito por Gururani *et al.*, (2015) para organismos transgênicos da gramínea zoysiagrass. Essa condição poderia restringir a entrada de elétrons não provenientes da água, causando, assim, maior eficiência do CEO na doação de elétrons para o FSII (DE RONDE *et al.*, 2004).

A fase I-P refere-se aos eventos de transferência de elétrons associados ao FSI (REDILLAS *et al.*, 2011; SCHANSKER *et al.*, 2003) e foi o estágio de maior influência do selênio no aparato fotossintético das amostras analisadas. As curvas $V_{OI} \geq 1$ de maior amplitude observadas para os tratamentos de 4 μM e 16 μM Se (Fig 4A) são, também, um indicativo dessas modulações na dinâmica de transporte de elétrons do intersistema para o FSI (YUSUF *et al.*, 2010). Além disso, ainda sugerem um aumento do tamanho do pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI (REDILLAS *et al.*, 2010). Os valores mais expressivos para ΔV_{IP} , também observados nesses tratamentos (Fig 4B), indicam uma maior contribuição relativa da fase I-P para a curva de emissão da fluorescência da clorofila *a* e abundância de unidades do FSI (CEPPI *et al.*, 2012). Schansker et al. (2005) demonstraram que o aumento da contribuição relativa da fase I-P para a curva de fluorescência depende tanto do fluxo de elétrons através do FSI quanto de um bloqueio do fluxo de elétrons no lado acceptor do FSI.

A normalização V_{IP} permite uma dedução no comportamento do fluxo de elétrons originados do intersistema para os receptores finais do FSI (MARTINS *et al.*, 2017), determinando, assim, uma estimativa da taxa global de redução dos aceptores finais do FSI (Fig 4B). Nas amostras cultivadas sob as concentrações de 4 μM e 16 μM Se houve um decréscimo em V_{IP} (Fig 4B) conforme descrito pela equação de Michaelis-Menten, onde o inverso do tempo para atingir $V_{IP} = 0,5$ é o determinante do decréscimo na capacidade de redução do FSI (YUSUF *et al.*, 2010).

Os dados sugerem, observando-se as amostras cultivadas com 4 μM e 16 μM Se, que a adição de Se no meio de cultivo não implica na proporcionalidade entre a taxa global de redução dos receptores finais do FSI e a quantidade de tempo e luz necessária para alcançar 50% da emissão da fase I-P (determinada pela fluorescência variável relativa entre os ponto I-P ou ΔV_{IP}) assim como descrito por Redillas *et al.*, (2010); Yusuf *et al.*, (2010) e Martins *et al.*, (2017) (Fig 4B-C). Todavia, essa demanda de tempo e luz averiguada por meio da análise de ΔV_{IP} parece ser proporcional ao aumento de unidades do FSI e contribuição relativa da fase I-P para a curva de emissão da fluorescência da clorofila *a* como observado para as amostras cultivadas sob 4 μM e 16 μM Se (Fig. 4B-C). Neste sentido, o selênio pode induzir mecanismos que incrementam a atividade do FSI. A importância desses mecanismos está na redução da foto-oxidação, direcionando elétrons para rotas alternativas como o fluxo cíclico de elétrons envolvendo o FSI, diminuindo, consequentemente, a formação de espécies reativas ao oxigênio (OUKARROUM *et al.*, 2015) e aumentando a redução de ferredoxina-Fd, outros intermediários e NADP^+ (YUSUF *et al.*, 2010; REDILLAS *et al.*, 2011).

Os parâmetros do JIP-test derivados dos transiente OJIP podem ser usados para caracterizar o comportamento/atividade do FSII, intersistema e FSI (STRASSER *et al.*, 2004; STRAUSS *et al.*, 2006; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2013). Esses parâmetros são considerados eficazes para localizar diferentes sítios de ação bem como a heterogeneidade do FSII (APPENROTH *et al.*, 2001; KALAJI *et al.*, 2016). Por exemplo, o aumento de ABS/RC sob 16 μM Se pode ser atribuído a dois fatores. O primeiro é o aumento do tamanho funcional da antena associada ao FSII, a qual supre os centros de reação com energia de excitação (YUSUF *et al.*, 2010). Uma vez que TR_0/RC aumentou proporcionalmente ao ABS/RC nas amostras cultivadas sob 16 μM Se, pode-se sugerir um comprometimento da dinâmica de transporte de elétrons do CEO para o FSII (CHEN *et al.*, 2014; KALAJI *et al.*, 2014), bem como da transferência de energia de excitação de centros de reação inativos para centros de reação ativos (LAVERGNE e LECI, 1993) (Fig. 5). Nas amostras cultivadas sob 16 μM Se foi observado, ainda, um decréscimo de RC/ABS (Fig. 5), parâmetro que informa sobre a estabilidade dos centros de reação e sua conexão com os complexos antena de captação de luz (CHEN *et al.*, 2014). Essa condição implica no segundo fator para o aumento de ABS/RC, isto é, a inativação de uma fração de centros de reação ativos transformando-os em não-redutores de Q_A (YUSUF *et al.*, 2010; REDILLAS *et al.*, 2011) (Fig. 5).

Decréscimos em RC/ABS podem ser um indicativo de susceptibilidade a fotoinibição e formação de centros de reação silenciosos (CHEN *et al.*, 2014). Dessa forma, pode-se inferir que, associado ao aumento de ABS/RC e TR_0/RC , o incremento em DI_0/RC observado após o cultivo das plantas sob 16 μM Se caracterizam uma transformação estrutural dos centros de reação em unidades que dissipam energia de excitação na forma de calor (STRASSER *et al.*, 2004) (Fig. 5). Essa condição poderia evitar a superprodução de Q_A^- (REDILLAS *et al.*, 2011) assim como diminuir a formação de ERO's, protegendo, dessa maneira, o sistema da excitação e redução excessiva (CHEN *et al.*, 2014). A sequência de parâmetros que caracterizam a transdução de energia por centro de reação do FSII são a absorção (ABS/RC), captura (TR_0/RC) e transporte de elétrons (ET_0/RC). Neste estudo, nenhuma alteração resultante dos tratamentos com baixas concentrações de selênio (02 μM e 04 μM) foi observada para estes parâmetros do JIP-test (Fig. 5). Finalmente, a análise dos valores de RE_0/RC , relacionado à redução dos aceptores finais do FSI, permitiu verificar aumentos significativos obtidos para 4 μM e 16 μM Se (Fig. 5). Estes resultados permitem caracterizar um incremento na contribuição da fase I-P para o transiente OJIP, conforme afirmado por Oukarroum *et al.*, (2009) e Paillotin *et al.*, (1976). Nessas concentrações de Se, a capacidade de transporte de elétrons entre a Q_A^- até os aceptores do FSI foi incrementada.

Neste estudo, decréscimos no rendimento quântico fotoquímico máximo do FSII (ϕP_0) foram obtidos nas amostras cultivadas em 16 μM Se, o que, de acordo com Hermans *et al.*, (2003), pode estar relacionado à conversão de centros redutores de Q_A em centros não redutores ou dissipadores (Fig. 6A) como descrito previamente quando se analisou os resultados obtidos para ABS/RC, RC/ABS e DI_0/RC (Fig. 5). Decréscimos em ϕP_0 podem ser considerados como indicadores de danos fotoinibitórios ao complexo FSII (BAKER e ROSENQVIST, 2004). Essa condição poderia alterar a forma das curvas OJIP tanto por decréscimos em F_m quanto em acréscimos de F_o (LIN *et al.*, 2009), assim como observado nas amostras sob 16 μM Se (Fig. 6A). Segundo Oukarroum *et al.*, (2009), estas alterações reduzem a eficiência com a qual um fóton absorvido seja capturado pelo centro de reação do FSII. Todos os parâmetros estruturais do teste JIP que caracterizam os eventos relacionados à estrutura do FSII e intersistema (ϕP_0 , ϕD_0 e ϕE_0) ou fases O-J e J-I, respectivamente (STRASSER *et al.*, 2004; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008), não diferiram entre as concentrações 0 μM , 2 μM e 4 μM Se (Fig. 6A). Assim, este resultado sugere que, nestas concentrações de selênio, a estabilidade do FSII e intersistema é mantida, sem quaisquer sinais de incremento ou diminuição. Ao contrário, os menores valores observados para ϕP_0 e ϕE_0 seguidos pelo aumento em ϕD_0 nas amostras

cultivadas sob 16 μM Se reforçam a ocorrência de fotoinibição (Fig. 6A), indicando um comprometimento da dinâmica de transporte e aproveitamento da energia de excitação (ZHUO *et al.*, 2017), e, assim, gerando uma limitação de *B. zebrina* à maiores concentrações de Se.

Incremento na transferência de elétrons ao longo do intersistema até a redução dos aceptores finais do FSI ocorreram nas amostras de *B. Zebrina* cultivadas sob 4 μM e 16 μM Se em relação aos demais tratamentos (Fig. 6A). O intersistema e o FSI podem ser potenciais sítios de ação do selênio. Essa inferência pode ser embasada pelo aumento da eficiência na transferência de elétrons a partir da plastoquinona reduzida até o ladoceptor do FSI, avaliada por meio da análise do parâmetro δRo (OUKARROUM *et al.*, 2009) observado sob 4 μM e 16 μM Se (Fig. 6A). Ainda, incrementos para esses tratamentos também foram observados quando se avaliou o rendimento quântico para a redução dos aceptores finais do FSI (TSIMILLI- MICHAEL e STRASSER, 2008) (Fig. 6A). Esse aumento da estabilidade para a redução dos aceptores finais do FSI atribuído ao selênio representa, provavelmente, um aumento do número dos centros de reação associados ao FSI (OUKARROUM *et al.*, 2009).

Finalmente, os índices de vitalidade (PI_{ABS} e PI_{Total}) representam o produto de alguns parâmetros funcionais e estruturais independentes (STRASSER *et al.*, 2004; KALAJI *et al.*, 2016). Maiores valores de PI indicam incrementos na habilidade potencial de conservação de energia do aparato fotossintético (YUSUF *et al.*, 2010). A similaridade dos valores de PI_{ABS} nas amostras cultivadas sob 0 μM , 2 μM e 4 μM Se indica que o selênio mantém a capacidade potencial de conservação de energia para redução dos aceptores de elétrons até o intersistema (YUSUF *et al.*, 2010; REDILLAS *et al.*, 2011; KRUGER *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2015) (Fig. B). Para o PI_{Total} , apenas as amostras sob 4 μM Se apresentaram incremento da capacidade de conservação de energia no aparato fotossintético (Fig. 6C). O PI_{Total} engloba, além dos parâmetros do PI_{ABS} , a probabilidade de um elétron do intersistema mover-se para reduzir os aceptores finais do ladoceptor do FSI (δRo) (TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008), para o qual observou-se incrementos (aprox. 30%) nas amostras cultivadas sob 4 μM Se. Esse incremento em δRo tornaram o valor do PI_{Total} das amostras que cresceram em 4 μM Se mais expressivos e sugerem, mais uma vez, que o sítio de ação do selênio possa ser entre o intersistema e o FSI (Fig. 6C). Por incorporar parâmetros que caracterizam todas as fases do transiente OJIP, o PI_{Total} é considerado por vários autores como o mais sensível parâmetro do teste JIP para caracterizar o estado fisiológico de plantas sob diferentes condições abióticas (STRASSER *et al.*, 2004; OUKARROUM *et al.*, 2007; YUSUF *et al.*, 2010; BRESTIC e ZIVCAK, 2013; KALAJI *et al.*, 2014).

2.5. Conclusão

Este estudo mostrou que sob 4 μM , o selênio aumenta a capacidade potencial de conservação de energia no aparato fotossintético (PI_{Total}) e mantém a estabilidade das reações de transporte de energia no FSII em *B. zebrina*. O principal incremento observado está na melhora da dinâmica de transporte de elétrons entre o intersistema e o FSI (avaliando-se δR_0), sugerindo que seja este seu sítio de ação dentro do aparato fotossintético. Dessa forma, utilizando *B. zebrina* como modelo, podemos inferir que o selênio na concentração de 4 μM pode causar incrementos na estrutura (avaliando-se RE_0/RC) e funcionalidade (avaliando-se ϕR_0 e δR_0) do aparato fotossintético. Ainda, conclui-se que *B. zebrina* não tolera concentrações iguais ou superiores a 16 μM de selênio, apresentando reduções no crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e desestabilidade na estrutura e funcionalidade do aparato fotossintético, especialmente no FSII. Sendo assim, do ponto de vista ecotoxicológico, o excesso de selênio representou toxicidade à espécie estudada.

2.6. Referências

- APPENROTH, K. J.; STÖCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. **Environmental Pollution**, v. 115, p. 49–64. 2001.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p.1-15. 1949.
- BACHIEGA, P.; SALGADO, J. M.; DE CARVALHO J. E.; RUIZ, A. L.; SCHWARZ, K.; TEZOTTO, T. Antioxidant and antiproliferative activities in different maturation stages of broccoli (*Brassica oleracea* Italica) biofortified with selenium. **Food Chemistry**, v.190, p.771–776. 2016.
- BAKER, N. R.; ROSENQVIST, E. Applications of chlorophyll fluorescence can improve crop production strategies: an examination of future possibilities. **Journal of Experimental Botany**, v. 55, p.1607-1621. 2004.
- BLACKBURN G. A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 855-867. 2007.
- BRESTIC, M.; CETNER, M. D.; GOLTSEV, V.; JAJOO, A.; KALAJI, H. M.; LADLE, R. J.; OUKARROUM, A.; SAMBORSKA, I. A.; LUKASIK, I.; & ZIVCAK, M. Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. **Acta Physiologiae Plantarum**, v. 38, p. 1-11. 2016.
- BRESTIC, M.; ZIVCAK, M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: Das, A. B.; Rout, G. R. (eds.) **Molecular stress physiology of plants**. Springer, New Dehli, pp 87–131. 2013.
- BROYER, T. C.; LEE, D. C.; ASHER, C. J. Selenium Nutrition of Green Plants. Effect of selenite supply on growth and selenium content of alfalfa and subterranean clover. **Plant Physiology**, v. 41, p. 1425–1428. 1966.
- CARTES, P.; GIANFREDA, L.; PAREDES, C.; MORA, M. L. The effect of seed pelletization with selenite on the yield and selenium uptake of ryegrass cultivars. In: **19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World**, Brisbane, Australia, pp. 310–313. 2010.
- CEPPI, M. G.; OUKARROUM, A.; CIÇEK, N.; STRASSER, R. J.; SCHANSKER, G. The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: a study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress. **Physiologia Plantarum**, v. 144, p. 277–288. 2012.
- CHEN, L. S.; CHENG, L. The acceptor side of photosystem II is damaged more severely than the donor side of photosystem II in ‘honeycrisp’ apple leaves with zonal chlorosis. **Acta Physiologia Plantarum**, v. 32, p. 253-261. 2010.
- CHEN, Q.; GUAN, T.; YUN, L.; LI, R.; RECKNAGEL, F. Online forecasting chlorophyll a concentrations by an auto-regressive integrated moving average model: feasibilities and potentials. **Harmful Algae** v. 43, p. 58–65. 2015.

- CHEN, S. G.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 84, p. 10–21. 2014.
- CHRISTEN, D.; SCHONMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R. J.; DÉFAGO, G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 504–514. 2007.
- DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G. H. J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211–1224. 2004.
- DIAO, M.; MA, L.; WANG, J.; CUI, J.; FU, A.; LIU, H. Selenium promotes the growth and photosynthesis of tomato seedlings under salt stress by enhancing chloroplast antioxidante defense system. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 33, p. 671–682. 2014.
- DJANAGUIRAMAN, M.; DEVI, A. K.; SHANKER, A.; SHEEBA, J. A.; BANGARUSAMY, U. Selenium: an antioxidative protectant in soybean during senescence. **Plant Soil**, v. 272, p. 77–86 2005.
- DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V. V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 999–1007. 2010.
- DONG, J. Z.; WANG, Y.; WANG, S. H.; YIN, L. P.; XU, G. J.; ZHENG, C.; LEIA, C.; ZHANGA, M. Z. Selenium increases chlorogenic acid, chlorophyll and carotenoids of *Lycium chinense* leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93: p. 310–315. 2013.
- FENG, R.; CHAOYANG W.; SHUXIN T. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 58–68. 2013.
- FENG, R.; WEI, C. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* L., a potential selenium phytoremediation plant. **Plant Soil and Environment**, v. 58, p. 105–110. 2012.
- FENG, T.; CHEN, S. S.; GAO, D. Q.; LIU, G. Q.; BAI, H. X.; LI, A.; PENG, L. X. Selenium improves photosynthesis and protects photosystem II in pear (*Pyrus bretschneideri*), grape (*Vitis vinifera*), and peach (*Prunus persica*). **Photosynthetica**, v. 53, p. 609–612. 2015.
- FENGA, R.; LIAO, G.; GUOA, J.; WANGA, R.; XUA, Y.; DINGA, Y.; MOC, L.; FANC, Z.; LID, N. Responses of root growth and antioxidative systems of paddy rice exposed to antimony and selenium. **Environmental and Experimental Botany**, v. 122, p. 29–38. 2016.
- FILEK, M.; KOSCIELNIAK, J.; LABANOWSKA, M.; BEDNARSKA, E.; BIDZINSKA, E. Selenium-induced rotection of photosynthesis activity in rape (*Brassica napus*) seedlings subjected to cadmium stress. Fluorescence and EPR measurements. **Photosynthesis Research**, v. 105, p. 27–37, 2010.
- FRANK H. A.; YOUNG A. J.; BRITTON, G.; COGDELL R. J. The photochemistry of carotenoids. In: **Advances in Photosynthesis and Respiration**. Govindjee (ed.), vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic.1999.

- GOLTSEV, V. N.; KALAJI, H. M.; PAUNOV, M.; BAĞA, W.; HORACZEK, T.; MOJSKI, J.; KOCIEL, H.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Variable Chlorophyll Fluorescence and its use for Assessing Physiological Condition of Plant Photosynthetic Apparatus. **Russian Journal of Plant Physiology**, v. 63, p. 881–907. 2016.
- GOLTSEV, V. N.; KALAJI, H. M.; PAUNOV, M.; BABA, W.; HORACZEK, T.; MOJSKI, J.; KOCIEL, H.; ALLAKHVERDIEV, S. I. Physiological and biochemical responses of transgenic potato plants with altered expression of PSII manganese stabilizing protein. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 58, p. 182-194. 2012.
- GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; GANESAN, M.; STRASSER, R. J.; HAN, Y.; KIM, J. I.; LEE, H. Y.; SONG, P. S. (2015). In Vivo Assessment of Cold Tolerance through Chlorophyll-*a* Fluorescence in Transgenic Zoysiagrass Expressing Mutant Phytochrome A. **PLoS ONE**, v. 10. 2015.
- HAN, D.; XIONG, S.; TU, S.; LIU, J.; CHEN, C. Interactive effects of selenium and arsenic on growth, antioxidant system, arsenic and selenium species of *Nicotiana tabacum* L. **Environmental and Experimental Botany**, v. 117, p. 12–19. 2015.
- HANSON, B.; GARIFULLINA, G.F.; LINDBLOM, S.D.; WANGELINE, A.; ACKLEY, A.; KRAMER, K.; NORTON, A.P.; LAWRENCE, C.B.; PILON SMITS, E.A.H. Selenium accumulation protects *Brassica juncea* from invertebrate herbivory and fungal infection. **New Phytologist**, v.159, p. 461–469. 2003.
- HARTIKAINEN, H.; EKHOLM, P.; PIIRONEN, V.; XUE, T.; KOIVU, T.; YLI-HALLA, M. Quality of the ryegrass and lettuce yields as affected by selenium fertilization. **Agricultural and Food Science**, v. 6, p. 381-387.1997.
- HARTIKAINEN, H.; XUE, T.; PIIRONEN, V. Selenium as na antioxidant and pro-oxidant in ryegrass. **Plant and Soil**, v. 225, p. 193–200. 2000.
- HASANUZZAMAN, M.; FUJITA, M. Selenium pretreatment upregulates the antioxidante defense and methylglyoxal detoxification system and confers enhanced tolerance to drought stress in rapeseed seedlings. **Biological Trace Element Research**, v. 143, p. 1758–1776. 2011.
- HERMANS, C.; SMEYERS, M.; RODRIGUEZ, R. M.; EYLETTERS, M.; STRASSER, R. J.; DELHAYE, J-P. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. **Journal of Plant Physiology**. 160:81-90. 2003.
- JIANG, H. X.; YANG, L. T.; QI, Y. P.; LU, Y. B.; HUANG, Z. R.; CHEN, L. S. Root iTRAQ protein profile analysis of two citrus species differing in aluminum-tolerance in response to long-term aluminum-toxicity. **BMC Genomics**, v. 16, p. 949-966. 2015.
- KALAJI, H. M.; OUKARROUM, A.; ALEXANDROV, V.; KOUZMANOVA, M.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; GOLTSEV V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 30, p. 1-10. 2014.
- KRÜGER, G. H. J.; DE VILLIERS, M. F; STRAUSS, A. J.; DE BEER, M.; VAN HEERDEN, P. D. R.; MALDONADO, R.; STRASSER, R. J. Inhibition of photosystem II activities in soybean (*Glycine max*) genotypes differing in chilling sensitivity. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 85-96. 2014.

- KRYUKOV G. V.; CASTELLANO S.; NOVOSELOV S.V.; LOBANOV A.V.; ZEHTAB O.; GUIGO R.; GLADYSHEV V. N. Characterization of mammalian selenoproteomes. **Science**, v. 300, p.1439–1443. 2003.
- LABANOWSKA, M.; FILEK, M.; KOSCIELNIAK, J.; KURDZIEL, M.; KULIS, E.; HARTIKAINEN, H. The effects of short-term selenium stress on Polish and Finnish wheat seedlings-EPR, enzymatic and fluorescence studies. **Journal of Plant Physiology**, v. 169, p. 275–284. 2012.
- LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. 2 ed. Springer, pp. 604. 2008.
- LAVERGNE, J.; LECI, E.; Properties of inactive photosystem II centers. **Photosynthesis Research**, v. 35, p. 323–343. 1993.
- LEHOTAI, N.; LYUBENOVA, L.; SCHRÖDER, P.; FEIGL, G.; ÖRDÖG, A.; SZILÁGYI, K.; KOLBERT, Z. Nitro-oxidative stress contributes to selenite toxicity in pea (*Pisum sativum* L). **Plant and Soil**, v. 400, p. 107-122. 2016.
- LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382. 1987.
- LIN, Z.H., CHEN, L.S., CHEN, R.B., ZHANG, F.Z., JIANG, H.X., TANG, N.: CO₂ assimilation, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. **BMC Plant Biology**, v. 9 (43), p. 1-12. 2009.
- LINDBLOM, S. D.; VALDEZ-BARILLAS, J. R.; FAKRA, S. C.; MARCUS, M. A.; WANGELINE, A. L.; PILON-SMITS, E. A. H. Influence of microbial associations on selenium localization and speciation in roots of *Astragalus* and *Stanleya* hyperaccumulators. **Environmental and Experimental Botany**, v. 88, p. 33-42. 2012.
- LIU, C.; LIU, Y.; GUO, K.; FAN D.; LI, G.; ZHENG, Y.; YU, L.; YANG, R. Effect of drought on pigments, osmotic adjustment and antioxidant enzymes in six woody plant species in karst habitats of southwestern China. **Environmental and Experimental Botany**, v. 71, p. 174-183. 2011.
- MAGER W.H., DE KRUIJFT A.J.I. Stress-induced transcriptional activation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 59, p. 506–531. 1995.
- MARTINS, J. P. R.; MARTINS¹, A. D.; FERREIRA PIRES, M. F.; BRAGA JUNIOR, R. A.; REIS, R. O.; DIAS, G. M. G.; PASQUAL, M. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** , v. 126(1), p. 43–57.2016.
- MARTINS, R. F. A.; SOUZA, A. F. C.; PITOL, C. AND FALQUETO, A. R. Physiological responses to intense water deficit in two genotypes of crambe (*Crambe abyssinica* Hochst.). **Australian Journal of Crop Science**, v. 11 (7), p. 821-827. 2017.
- MECHORA, S.; STIBILJ, V.; GERMA, M. The uptake and distribution of selenium in three aquatic plants grown in Se (IV) solution. **Aquatic Toxicology**, v.128– 129, p. 53– 59. 2013.
- MEHTA, P., JAJOO, A., MATHUR, S., BHARTI, S.: Chlorophyll *a* fluorescence study revealing effects of hight salt stress on Photosystem II in wheat leaves. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 16-20. 2010.

- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473-497. 1962.
- NING, N.; YUAN, X. Y.; DONG, S. Q.; WEN, Y. Y.; GAO, Z. P.; GUO1, M. J.; GUO, P. Y. Increasing selenium and yellow pigment concentrations in foxtail millet (*Setaria italica* L.) grain with foliar application of selenite. **Biological Trace Element Research**, v. 170, p. 245–252. 2016.
- OUKARROUM, A.; BUSSOTTI, F.; GOLTSEV, V.; HAZEM, M.; KALAJI, H. M. Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 80–88. 2015.
- OUKARROUM, A.; MADIDI, S. E. L.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438-446. 2007.
- OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 188-199. 2009.
- OWUSU-SEKYERE, A.; KONTTURI, J.; HAJIBOLAND, R.; RAHMAT, S.; ALIASGHARZAD, N.; HARTIKAINEN, H.; SEPPÄNEN, M. M. Influence of selenium (Se) on carbohydrate metabolism, nodulation and growth in alfalfa (*Medicago sativa* L.). **Plant and Soil**, v. 373, p. 541-552. 2013.
- PAILLOTIN, G. Movement of excitations in the photosynthetic domains of photosystem I. **Journal of Theoretical Biology**, v. 58, p. 337–352. 1976.
- PATHRE, U.; MOHANTY, P (eds), **Probing Photosynthesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**, Taylor & Francis, 2000. 445-483 p.
- PILON-SMITH, E.; QUIN, C.; TAPKEN, W.; MALAGOLI, M.; SCHIAVON, M. Physiological functions of beneficial elements. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 12, p. 267-274. 2009.
- PILON-SMITS, E. A.; LE DUC, D. L. Phytoremediation of selenium using transgenic plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20(2), p. 207–212. 2009.
- POLLASTRINI, M.; NOGALES, A. G.; BENAVIDES, R.; BONAL, D.; FINER, L.; FOTELLI, M.; GESSLER, A.; GROSSIORD, C.; RADOGLU, K.; STRASSER, R. J.; BUSSOTTI, F. Tree diversity affects chlorophyll *a* fluorescence and other leaf traits of tree species in a boreal forest. **Tree Physiology**, v. 00, p. 1–10. 2017.
- QING, X.; ZHAO, X.; HU, C.; WANG, P.; ZHANG, Y.; ZHANG, X. Selenium alleviates chromium toxicity by preventing oxidative stress in cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*) leaves. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 114, p. 179–189. 2015.

- REDILLAS, M.C.F.R., STRASSER, R.J., JEONG, J.S., KIM, Y.S., KIM, J.K.: The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. **Plant Biotechnology Reports**, v. 5, p.169-175. 2011.
- SCHANSKER, G.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE, STRASSER, R. J. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 785–796. 2003.
- SCHANSKER, G.; TÓTH, S. Z.; STRASSER, R. J.; Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1706, p. 250-261. 2005.
- SEPPANEN, M.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H, Selenium effects on oxidative stress in potato. **Plant Science**, v. 165, p. 311–319. 2003.
- STADTMAN, T. C. Selenocysteine. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, p. 83–100. 1996.
- STRASSER, B. J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, v. 52, p. 147-155. 1997.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis (ed.), **Photosynthesis: from Light to Biosphere**, pp.977-980. Springer Netherlands. 1995.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, In: G. Papageogiou, Govindjee (eds.), **Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration**, Springer, Dordrecht, 2004. v. 19, p. 321-362.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transiente as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In YUMUS, M.;
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313–1326, 2010.
- STRAUSS, A. J.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; HEERDEN, P.D.R.V. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 147–157. 2006.
- TANG, H.; LIU, Y.; GONG, X.; ZENG, G.; ZHENG, B.; WANG, D.; SUN, Z.; ZHOU, L.; ZENG, X. Effects of selenium and silicon on enhancing antioxidative capacity in ramie (*Boehmeria nivea* L. Gaud.) under cadmium stress. **Environmental Science and Pollution Research** , v. 22, p. 9999–10008. 2015.
- TAUSZ, M.; HIETZ, P.; BRIONES, O. The significance of carotenoids and tocopherols in photoprotection of seven epiphytic fern species of a Mexican cloud forest. **Australian Journal of Plant Physiology**, v. 28 p. 775-783. 2001.
- TERRY, N.; ZAYED, A. M.; DE SOUZA, M. P.; TARUN, A. S. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 401-432. 2000.

- TIAN, M.; XU, X.; LIU, Y.; XIE, L.; PAN, S. Effect of Se treatment on glucosinolate metabolism and health-promoting compounds in the broccoli sprouts of three cultivars. **Food Chemistry**, v. 190, 374–380. 2016.
- TOTH, S. Z.; NAGY, V.; PUTHUR, J. T.; KOVACS, L.; AND GARAB, G. **Plant Physiology**, v. 156, p. 382–392. 2011.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. *In vivo* assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants, In: Varma, A. (ed.), **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco- Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**, Springer, Dordrecht, 2008, pp. 679–703.
- TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 289–320. 2013.
- TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H.; EKHOLM, P.; SEPPANEN, M.M. Distribution of selenium in different biochemical fractions and raw darkening degree of potato (*Solanum tuberosum*) tubers supplemented with selenate. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 8617–8622. 2006.
- VITOVA, M.; BISOVA, K.; HLAVOVA, M.; ZACHLEDER, V.; RUCKI, M.; CIZKOVA, M. Glutathione peroxidase activity in the selenium-treated alga *Scenedesmus quadricauda*. **Aquatic Toxicology**, v. 102 (1–2), p. 87–94. 2011.
- WANG, Y. D.; WANG, X.; WONG, Y. S. Proteomics analysis reveals multiple regulatory mechanisms in response to selenium in rice. **Journal of Proteomics**, v. 75, p. 184–1866. 2012.
- XUE, T.; HARTIKAINEN, H.; PIIRONEN, V. Antioxidative and growth promoting effect of selenium in senescing lettuce. **Plant Soil**, v. 237, p. 55–61. 2001.
- YAO, X. Q.; CHU, J. Z.; BA, C. J. Responses of wheat roots to exogenous selenium supply under enhanced ultraviolet- B. **Biological Trace Element Research**, v. 137, p. 244–252. 2010.
- YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428–1438. 2010.
- ZHANG, L.; ACKLEY, A. R.; PILON-SMITS, E. A. H. Variation in selenium tolerance and accumulation among *Arabidopsis thaliana* accessions. **Plant Physiology**, v. 164, p. 327–336. 2007.
- ZHONG, N.; ZHONG, L.; HAO, L.; LUAN, C.; LI, X. Speciation of selenium in enriched garlic sprouts by high-performance liquid chromatography coupled with inductively coupled plasma-mass spectrometry. **Analytical Letters**, v. 48 (1), p. 180–187. 2015.
- ZHU, Y. G.; PILON-SMITS, E. A. H.; ZHAO, F. J.; WILLIAMS, P. N.; MEHARG, A. A. Selenium in higher plants: understanding mechanisms for biofortification and phytoremediation. **Trends in Plant Science**, v. 14, p. 436–442. 2009.

ZHUO, Y.; QIUA, S.; AMOMBO, E.; ZHU, Q.; TANG, D.; HUANG, M.; HAN, X.; CHEN, L.; WANG, S.; CHEN, K.; SUN, J. Nitric oxide alleviates cadmium toxicity in tall fescue photosystem II on the electron donor side. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 110–118. 2017.

ZUSHI, K.; MATSUZOE, N. Using of chlorophyll a fluorescence OJIP transients for sensing salt stress in the leaves and fruits of tomato. **Scientia Horticulturae**, v. 219, p. 216–221. 2017.

3. Capítulo II: Ação atenuante do selênio (Se) sobre o aparato fotossintético de *Billbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) frente ao excesso e escassez de zinco (Zn) *in vitro*.

Resumo

*Efeitos benéficos do selênio (Se), quando em baixas concentrações, tem sido descritos para diferentes espécies vegetais. Todavia o Se não é um elemento essencial para as plantas e seus mecanismos de ação ainda não estão claros. O zinco (Zn), por sua vez, é um micronutriente essencial envolvido em várias funções celulares. O excesso de Zn pode ser tóxico para as plantas e o Se, por meio de diferentes mecanismos de desintoxicação, tem sido citado como um atenuante aos efeitos deletérios de fatores abióticos como os metais pesados. Neste contexto, propôs-se avaliar a potencial ação atenuante do Se sobre o aparato fotossintético de *Bilbergia zebrina* (Herbert) Lindley (Bromeliaceae) frente a escassez e excesso de Zn *in vitro*. Para isso, brotos laterais de *B. zebrina* foram cultivados em meio MS com diferentes concentrações de Zn isoladas (0, 30 e 300 μ M) e combinadas com 4 μ M de Se (0+Se, 30+Se e 300+Se μ M), definida a partir estudos preliminares. Após 75 dias, avaliou-se o estado nutricional das amostras, a concentração de pigmentos fotossintéticos e a fluorescência de clorofila *a*. Este estudo demonstrou que o Se confere ao aparato fotossintético de *B. zebrina* a capacidade de melhorar o aproveitamento de energia, estabilizando a dinâmica de absorção, captura e transporte de elétrons. Assim, sob condições de déficit ou de excesso de Zn, o Se protege as funções do FSII. Ainda, de acordo com o teste JIP, a absorção de Zn proporcional às concentrações utilizadas, não causou interferências significativas na funcionalidade ou estrutura do aparato fotossintético. Dessa forma, pode-se considerar que a espécie *B. zebrina* exiba eventual capacidade para acumulação de Zn, apresentando, dessa forma, potenciais características para biomonitoramento.*

Palavras-chave: bromélia, fluorescência da clorofila *a*, aparato fotossintético, cultivo *in vitro*, fisiologia vegetal.

Abstract

Beneficial effects of selenium (Se), when in low concentrations, have been described for different plant species. However, Se is not an essential element for plants and its action mechanisms are still unclear. Zinc (Zn), in turn, is an essential micronutrient involved in various cellular functions. Excess Zn can be toxic to plants and Se, through different detoxification mechanisms, has been cited as an attenuating to the deleterious effects of abiotic factors such as heavy metals. In this context, it was proposed to evaluate the potential Se attenuating action on the Bilbergia zebrina (Herbert) Lindley photosynthetic apparatus in the face of scarcity and excess of Zn in vitro. For this, B. zebrina lateral shoots were cultured in MS medium with different Zn concentrations isolated (0, 30 and 300 μM) and combined with 4 μM Se (0 + Se, 30 + Se and 300 + Se μM), defined from previous studies. After 75 days, the nutritional status of the samples, the concentration of photosynthetic pigments and the chlorophyll a fluorescence were evaluated. This study demonstrated that Se gives the B. zebrina photosynthetic apparatus the ability to improve the energy utilization, stabilizing the dynamics of absorption, capture and electrons transport. Thus, independent of the Zn scarcity or excess, Se protects PSII functions. Furthermore, according to the JIP test, the Zn absorption proportional to the concentrations used, did not cause significant interferences in the photosynthetic apparatus functionality or structure. Thus, it can be considered that the species B. zebrina exhibits eventual capacity for Zn accumulation, thus presenting potential characteristics for biomonitoring.

Keywords: bromeliad, chlorophyll *a* fluorescence, photosynthetic apparatus, *in vitro* culture, plant physiology.

Lista de tabelas

Tabela 1: Efeito do zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se) sobre a absorção de macro e micronutrientes em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 54

Tabela 2: Efeito de diferentes tratamentos com zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se) sobre parâmetros derivados da análise do teste JIP em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. São eles: fluxo de absorção de energia por centro de reação, (ABS/RC), densidade de centros de reação que funcionaram como redutores de Q_A (RC/ABS), rendimentos quânticos para: a fotoquímica primária (ϕP_0), dissipação de calor (ϕD_0), conversão da energia de excitação para o transporte de elétrons (ϕE_0), redução dos aceptores finais do FSI(ϕR_0). Ainda, probabilidades de: um éxciton capturado mover-se para além da Q_A^- (ψE_0) e um elétron do intersistema mover-se para o lado acceptor do FSI (δR_0). Letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 57

Lista de figuras

Figura 1: Efeito do zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se) sobre a concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides) em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 54

Figura 2: Efeito do zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se) sobre: (A) a curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila *a* e (B) pontos do transiente OJIP (O = 0,02 ms, K = 0,3 ms, J = 2 ms, I = 30 ms e P = 300 ms) em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Letras distintas mostradas no gráfico B referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 55

Figura 3: (A) variação da banda J (2 ms) ou ΔV_t estabelecidas entre 0,01 e 300 ms a partir da normalização $\Delta V_t = [V_t (\text{controle}) - V_t (\text{tratamento})]$, (B) Variação da banda L (0,15 ms) ou ΔV_{OK} estabelecidas entre 0 e 0,3 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OK} = [V_{OK} (\text{controle}) - V_{OK} (\text{tratamento})]$, onde $V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$ e (C) variação da banda K (0,3 ms) ou ΔV_{OJ} estabelecida entre 0 e 2 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OJ} = [V_{OJ} (\text{controle}) - V_{OJ} (\text{tratamento})]$, onde $V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes tratamentos com zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se)..... 56

Figura 4: (A) Normalização entre F_0 e F_I onde $V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$, sendo $V_{OI} \geq 1$ no intervalo de 30 a 300 ms e (B) $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes tratamentos com zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se). Letras distintas mostradas no gráfico B referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância..... 56

3.1. Introdução

Diferentes efeitos benéficos do selênio (Se) às plantas tem sido apresentados na literatura. Dentre eles, incrementos no crescimento, redução dos danos causados pelo estresse oxidativo induzido (VALKAMA *et al.*, 2003), aumento do teor de clorofila (SEPPANEN *et al.*, 2003), estimulação da produção de antioxidantes e melhora a tolerância das plantas ao estresse por meio de mecanismos de osmorregulação (KUZNETSOV *et al.*, 2003; DJANAGUIRAMAN *et al.*, 2010). Por outro lado, a contaminação por metais pesados ou metalóides tornou-se uma preocupação crescente. A acumulação de grandes quantidades de metais pesados nas plantas desencadeiam diferentes alterações metabólicas, modificando a conformação de enzimas, proteínas transportadoras e proteínas reguladoras (VAN ASSCHE e CLIJSTERS, 1990).

Dentre esses metais pesados, o zinco (Zn) é um micronutriente essencial que desempenha um papel fundamental como cofator de enzimas envolvidas em várias funções celulares (HOFMANN, 2012). No entanto, o excesso de Zn pode ser tóxico para as plantas (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2013), alterando a homeostase celular e produzindo espécies reativas de oxigênio (ERO's) (FEIGL *et al.*, 2015). Essas ERO's causam danos oxidativos a lipídios da membrana e biomoléculas, inibindo o metabolismo celular e retardando as reações fotossintéticas. Todos estes danos conduzem a decréscimos no crescimento e produtividade da planta (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2013; KUPPER e ANDRESEN, 2016).

O selênio tem sido citado como um atenuante aos efeitos deletério de fatores abióticos como os metais pesados (KUMAR *et al.*, 2012). Os possíveis mecanismos de ação do Se na tolerância das plantas aos estresses ambientais não estão totalmente esclarecidos. Em doses adequadas, essa propriedade atenuante do Se pode proteger as plantas contra os danos causados por metais pesados como o zinco (Zn) (FENG *et al.*, 2013). Os mecanismos de desintoxicação de metais pesados pelo Se podem estar associados à inibição da absorção e translocação dos metais pesados e/ou a sua transformação em espécies não tóxicas, assim como a outros mecanismos bioquímicos relacionados ao aumento da capacidade antioxidante e estabilidade estrutural das células (FILEK *et al.*, 2010; MALIK *et al.*, 2012).

Plantas epífitas como a bromélia *Bilbergia zebrina* (Herbert) Lindley, utilizada como modelo nesse estudo, têm uma característica específica em relação às demais, na medida em que a absorção de metais pesados ocorrem pelo ar (MARTINS *et al.*, 2016). Assim, praticamente toda a água e nutrientes minerais são fornecido pela atmosfera. Por esse motivo, o conteúdo do seu

tecido reflete bem os níveis atmosféricos de alguns elementos tóxicos (FIGUEIREDO *et al.*, 2007). Nesse contexto, a técnica de cultura *in vitro* é vantajosa pois permite isolar os efeitos dos metais pesados no metabolismo da planta dos efeitos de outros estresses. Associado a esta, a análise de fluorescência da clorofila *a*, uma técnica não destrutiva que permite caracterizar os efeitos de estresses ambientais sobre a capacidade de transferência de energia da luz na cadeia de transporte de elétrons, tem sido uma importante ferramenta utilizada para avaliar a eficiência fotoquímica de plantas *in vitro* e *in vivo* (STRASSER *et al.*, 2004; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER, 2008; STRASSER *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2015; MARTINS *et al.*, 2015). Dessa forma, o objetivo desse estudo foi caracterizar a potencial ação atenuante do selênio sobre o aparato fotossintético de *B. zebrina* frente a diferentes concentrações de zinco *in vitro*.

3.2. Material e métodos

3.2.1. *Material vegetal e exposição aos tratamentos com selênio e/ou zinco durante o crescimento in vitro*

Broto laterais de *B. zebrina*, obtidos de plantas previamente estabelecidas *in vitro*, foram individualizados com auxílio de bisturi e transferidos, em um número de cinco, para potes de vidro de 268 ml contendo 50 ml de meio de cultivo MS (MURASHIGE e SKOOG, 1962) suplementado com 30 g L⁻¹ de sacarose e solidificado com 3,5 g L⁻¹ de ágar. O zinco foi adicionado isoladamente em três tratamentos com as seguintes concentrações: 0, 30 e 300 µM. Outros três tratamentos com as mesmas concentrações de zinco foram combinados com 4 µM selênio, definida a partir de estudos prévios. O sulfato de zinco (ZnSO₄) foi usado como fonte de zinco e o selenito de sódio (Na₂SeO₃) como fonte de selênio. Para ambos, foi considerado apenas o peso molecular do elemento de interesse (zinco e selênio) para os cálculos. O pH do meio de cultivo foi ajustado em 5,8 antes da autoclavagem a 120 °C durante 20 minutos. Após inoculação em câmara de fluxo laminar, o material vegetal foi mantido em sala de crescimento por 75 dias à temperatura de 26 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 horas.

3.2.2. *Análise de crescimento*

Para avaliar o crescimento das plantas *in vitro*, cinquenta plantas de cada tratamento foram coletadas aleatoriamente, divididas em dez parcelas e pesadas em balança de precisão. Assim, foram determinadas em gramas (g), a massa fresca (MF) das raízes e a massa fresca da parte aérea.

3.2.3. *Análise do conteúdo de pigmentos fotossintéticos*

Para a quantificação dos pigmentos fotossintéticos foram utilizadas 12 plantas, coletando-se 30 mg de material vegetal extraído da terceira folha totalmente expandida por repetição ($n = 12$). O material vegetal foi acondicionado em tubos de ensaio contendo 5 ml de acetona 80% e mantido sob temperatura de 4°C e no escuro por 48 horas para posterior análise espectrofotométrica. As leituras foram feitas a $\lambda = 480$, $\lambda = 645$, $\lambda = 665$ nm para carotenoides, clorofila *a* e clorofila *b*, respectivamente. Os teores dos pigmentos fotossintéticos, expressos em $\text{mg.g}^{-1}\text{MF}$ (massa fresca), foram calculados de acordo com as equações de Arnon (1949) e Lichtenthaler *et al.*, (1987).

3.2.4. *Análise da fluorescência da clorofila *a**

A fluorescência transiente da clorofila *a* foi medida após 75 dias de cultivo sob os tratamentos com zinco e/ou selênio. As medidas foram feitas em 12 plantas por tratamento sempre na terceira folha totalmente expandida contada a partir do centro da roseta. As folhas foram previamente adaptadas ao escuro por 30 minutos utilizando clipes foliares (Hanstech) para a oxidação completa do sistema fotossintético. Os transientes foram induzidos com 1s de iluminação por um pulso de luz saturante com intensidade máxima de $3000 \mu\text{mol}$ (fótons) $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$ em uma área foliar de 4 mm de diâmetro utilizando-se um fluorômetro portátil (Handy PEA, Hansatech Instruments Ltd., King's Lynn, Norfolk, UK). A emissão de fluorescência transiente foi, então, registrada de 10 ms a 1 s com 120 pontos de fluorescência. A partir da fluorescência transiente OJIP, o teste JIP foi avaliado com base na Teoria de Fluxo de Energia em Biomembranas (STRASSER e STRASSER, 1995; STRASSER *et al.*, 2004).

3.2.5. *Análise estatística*

O desenho amostral foi inteiramente casualizado. Os parâmetros do JIP-test, pigmentos fotossintéticos, quantificação de nutrientes e crescimento foram submetidos a uma análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas usando o teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade. Para isso foi utilizado o software SISVAR.

3.3. Resultados

A absorção do zinco foi proporcional às concentrações testadas (Tabela 1). Os tratamentos não influenciaram na absorção da maioria dos macronutrientes quantificados (N, P, K, Ca e Mg). Apenas a absorção do enxofre (S) diminuiu nos tratamentos com selênio e no controle ($0\mu\text{M}$ Zn) (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito do zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se) sobre a absorção de macro e micronutrientes em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância

Nutriente	Zn 0	Zn 0+Se	Zn 30	Zn 30+Se	Zn 300	Zn 300+Se
% N	4.4 \pm 0.00 a	4.8 \pm 0.31 a	4.8 \pm 0.23 a	4.6 \pm 0.09 a	4.2 \pm 0.12 a	4.1 \pm 0.07 a
% P	0.2 \pm 0.00 a	0.2 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.01 a	0.3 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.01 a
% K	3.9 \pm 0.04 a	4.0 \pm 0.08 a	4.3 \pm 0.24 a	4.1 \pm 0.08 a	4.1 \pm 0.07 a	3.9 \pm 0.09 a
% Ca	0.6 \pm 0.00 a	0.6 \pm 0.03 a	0.6 \pm 0.05 a	0.6 \pm 0.01 a	0.5 \pm 0.01 a	0.5 \pm 0.04 a
% Mg	0.2 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.01 a	0.2 \pm 0.02 a	0.2 \pm 0.01 a
% S	0.3 \pm 0.01 b	0.3 \pm 0.01 b	0.4 \pm 0.03 a	0.3 \pm 0.01 b	0.4 \pm 0.02 a	0.3 \pm 0.01 b
Cu (ppm)	2.2 \pm 0.14 a	1.7 \pm 0.29 a	3.5 \pm 0.17 a	2.2 \pm 0.24 a	1.9 \pm 0.34 a	1.7 \pm 0.11 a
Mn (ppm)	246.6 \pm 6.69 a	240.8 \pm 8.06 a	233.9 \pm 8.67 a	216.1 \pm 12.64 a	209.6 \pm 15.04 a	185.6 \pm 13.66 a
Zn (ppm)	35.5 \pm 1.17 c	43.7 \pm 3.42 c	80.0 \pm 5.63 b	91.0 \pm 3.99 b	281.5 \pm 0.45 a	271.4 \pm 18.11 a
Fe (ppm)	84.7 \pm 21.09 a	91.3 \pm 15.17 a	70.2 \pm 13.06 a	103.5 \pm 25.58 a	122.9 \pm 35.54 a	191.8 \pm 69.57 a

Avaliando-se a concentração de pigmentos fotossintéticos, houve um incremento na concentração de clorofila *a* e clorofilas totais nas amostras cultivadas sob 0 μM Zn+Se (Figura 1). Para clorofila *b* e carotenoides, as amostras submetidas a 0 μM Zn+Se e 30 μM Zn+Se apresentaram os maiores valores (Figura 1).

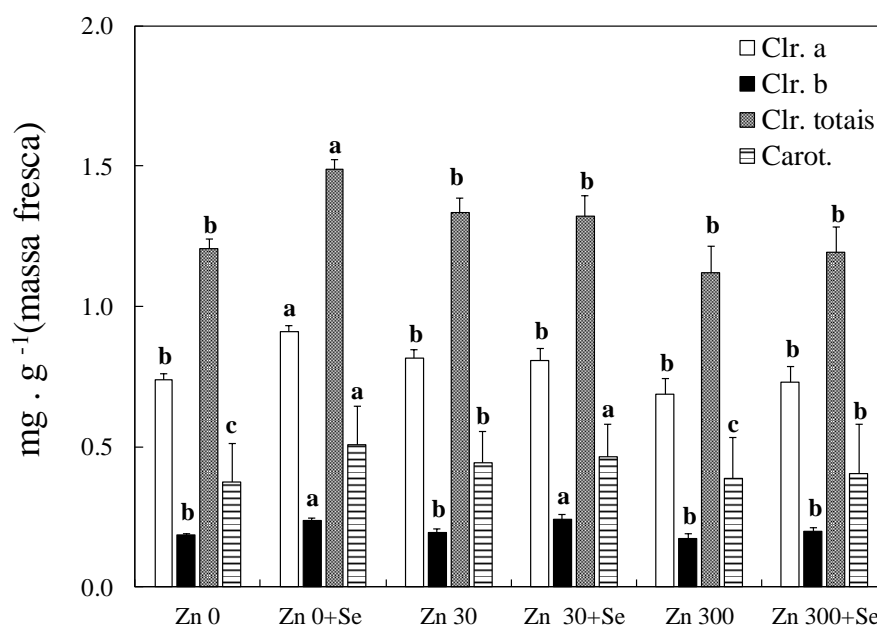


Figura 1: Efeito do zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se) sobre a concentração de pigmentos fotossintéticos (clorofila *a*, clorofila *b*, clorofilas totais e carotenoides) em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

As amostras de *B. zebrina*, quando submetidas a tratamentos com selênio e/ou zinco *in vitro*, mantiveram-se fotossinteticamente ativas, visto que apresentaram curvas OJIP com aumento polifásico característico (Figura 2A). Relativo aos tratamentos sem selênio (0 μM Zn, 30 μM Zn

e 300 μ M Zn) houve diminuição da fluorescência inicial, F_o ($O = 0,02$ ms) nas amostras cultivadas sob 30 μ M Zn+Se e 300 μ M Zn+Se, enquanto que, da fluorescência obtida aos 0,3 ms (F_K) todas as amostras cultivadas com selênio apresentaram supressão (Fig. 2B). Ainda, diminuição dos sinais de fluorescência obtidos aos 2 ms (F_J) ocorreram em todas as amostras sob tratamentos com selênio, sendo mais expressivo naquelas cultivadas em 300 μ M Zn+Se. Para o ponto $I = 30$ ms e $P = 300$ ms, sob os tratamentos com 0 μ M Zn+Se e 300 μ M Zn+Se também houve diminuição da emissão dos sinais de fluorescência (Figura 2B).

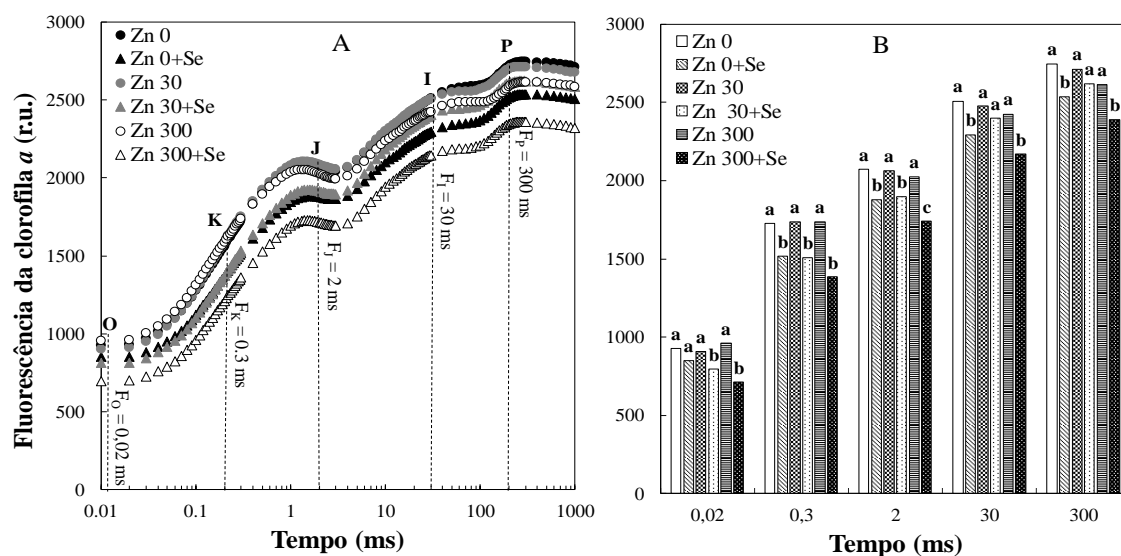


Figura 2: Efeito do zinco e selênio isolados e combinados (0 μ M Zn, 30 μ M Zn, 300 μ M Zn, 0 μ M Zn+Se, 30 μ M Zn+Se, 300 μ M Zn+Se) sobre: (A) a curva polifásica de emissão da fluorescência da clorofila *a* e (B) pontos do transiente OJIP ($O = 0,02$ ms, $K = 0,3$ ms, $J = 2$ ms, $I = 30$ ms e $P = 300$ ms) em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. Letras distintas mostradas no gráfico B referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Utilizando das normalizações relativas ao ΔV_t , estabelecidas entre 0,02 e 300 ms, observou-se desvio negativo da banda-J para todos os tratamentos com selênio e positivo para aquelas tratadas apenas com zinco (Figura 3A). De igual modo, diferença negativa foi observada para as bandas L e K (ΔV_{OK} , e ΔV_{OJ} estabelecidos entre 0-0,3 e 0-2 ms, respectivamente) nas amostras cultivadas sob tratamentos com selênio. Ao contrário, nas amostras cultivadas sob 30 μ M Zn e 300 μ M Zn, observou-se bandas L e K com diferenças positivas comparativamente ao controle ou 0 μ M Zn (Figura 3B - C).

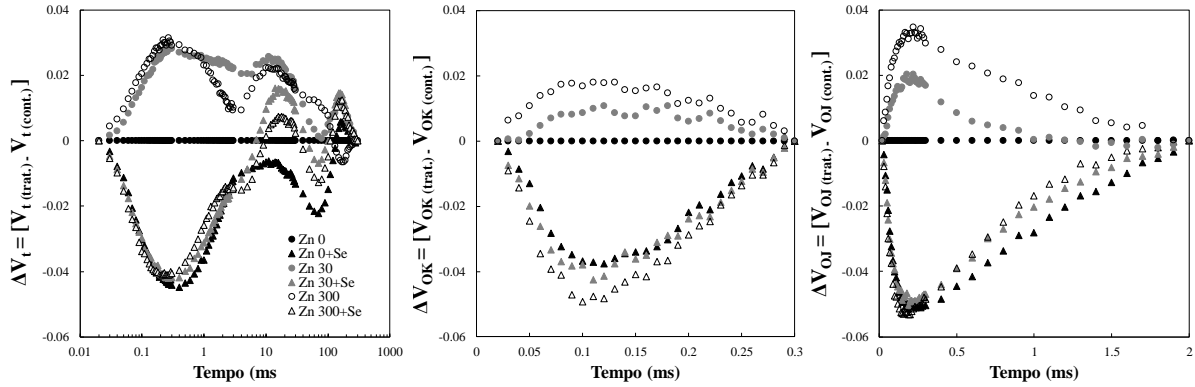


Figura 3: (A) Diferença cinética entre os pontos O (0,02 ms) e P (300 ms) ou ΔV_t estabelecidas entre 0,01 e 300 ms a partir da normalização $\Delta V_t = [V_t(\text{controle}) - V_t(\text{tratamento})]$, (B) Variação da banda L (0,15 ms) ou ΔV_{OK} estabelecidas entre 0 e 0,3 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OK} = [V_{OK}(\text{controle}) - V_{OK}(\text{tratamento})]$, onde $V_{OK} = (F_t - F_0) / (F_K - F_0)$ e (C) variação da banda K (0,3 ms) ou ΔV_{OJ} estabelecida entre 0 e 2 ms a partir da dupla normalização $\Delta V_{OJ} = [V_{OJ}(\text{controle}) - V_{OJ}(\text{tratamento})]$, onde $V_{OJ} = (F_t - F_0) / (F_J - F_0)$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes tratamentos com zinco e selênio isolados e combinados (0 μM Zn, 30 μM Zn, 300 μM Zn, 0 μM Zn+Se, 30 μM Zn+Se, 300 μM Zn+Se).

Comparativamente às amostras cultivadas apenas com zinco, em suas respectivas concentrações, aquelas cultivadas sob tratamentos com selênio apresentaram curvas de maior amplitude para a fluorescência relativa referente a $V_{OI} \geq 1$, obtida no intervalo de 30 a 300 ms. (Figura 4A). O $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$ aumentou em todas as amostras cultivadas sob tratamentos com selênio (Figura 4B).

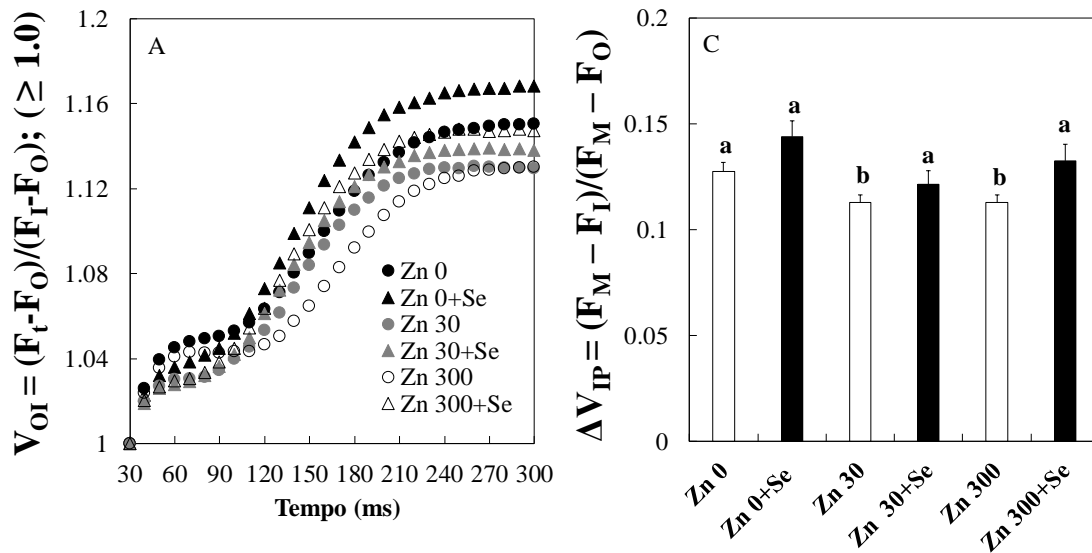


Figura 4: (A) Normalização entre F_0 e F_I onde $V_{OI} = (F_t - F_0) / (F_I - F_0)$, sendo $V_{OI} \geq 1$ no intervalo de 30 a 300 ms e (B) $\Delta V_{IP} = (F_M - F_I) / (F_M - F_0)$ em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro* sob diferentes tratamentos com zinco e selênio isolados e combinados. Letras distintas mostradas no gráfico B referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Os parâmetros de fluxo específico de energia extraídos do teste JIP evidenciaram aumento nos valores de ABS/RC para as amostras cultivadas em tratamentos apenas com zinco, deferindo-

se significativamente daquelas sob tratamentos de zinco combinados com selênio (Tabela 2). Para o PI_{Total} , os maiores índices foram observados para as amostras cultivadas sob tratamentos com selênio assim como para RC/ABS (Tabela 2). O $\phi P_0 = TR_0/ABS$ foi maior e equivalente para 30 μ M Zn+Se e 300 μ M Zn+Se. Assim, sob estes tratamentos, as amostras apresentaram menores valores de $\phi D_0 = DI_0/ABS$, uma vez que estes são parâmetros inversamente proporcionais (Tabela 2). Ainda, os maiores valores de $\phi E_0 = ET_0/ABS$ e $\psi E_0 = ET_0/TR_0$ foram observados para os tratamentos com selênio. Nenhuma diferença entre os tratamentos foi observada para $\delta R_0 = RE_0/ET_0$, enquanto que para $\phi R_0 = RE_0/ABS$, as amostras cultivadas sob 30 μ M Zn e 300 μ M Zn apresentaram diminuição comparativamente as demais (Tabela 2).

Tabela 2: Efeito de diferentes tratamentos com zinco e selênio isolados e combinados (0 μ M Zn, 30 μ M Zn, 300 μ M Zn, 0 μ M Zn+Se, 30 μ M Zn+Se, 300 μ M Zn+Se) sobre parâmetros derivados da análise do teste JIP em plantas de *Billbergia zebrina* cultivadas *in vitro*. São eles: fluxo de absorção de energia por centro de reação, (ABS/RC), densidade de centros de reação que funcionaram como redutores de Q_A (RC/ABS), rendimentos quânticos para: a fotoquímica primária (ϕP_0), dissipação de calor (ϕD_0), conversão da energia de excitação para o transporte de elétrons (ϕE_0), redução dos aceptores finais do FSI (ϕR_0). Ainda, probabilidades de: um éxciton capturado mover-se para além da Q_A^- (ψE_0) e um elétron do intersistema mover-se para o lado acceptor do FSI (δR_0). Letras distintas referem-se às diferenças significativas encontradas entre os tratamentos de acordo com o teste de Scott-Knott a 5% de significância

Parâmetro	Zn 0	Zn 0 + Se	Zn 30	Zn 30 + Se	Zn 300	Zn 300 + Se
ABS/RC	4.328 \pm 0.134 a	3.925 \pm 0.100 b	4.466 \pm 0.126 a	3.753 \pm 0.146 b	4.820 \pm 0.240 a	3.738 \pm 0.131 b
RC/ABS	0.234 \pm 0.007 b	0.257 \pm 0.007 a	0.226 \pm 0.007 b	0.271 \pm 0.010 a	0.213 \pm 0.010 b	0.271 \pm 0.010 a
ϕP_0	0.615 \pm 0.615 b	0.626 \pm 0.626 b	0.613 \pm 0.613 b	0.658 \pm 0.658 a	0.583 \pm 0.583 c	0.665 \pm 0.665 a
ψE_0	0.398 \pm 0.398 b	0.414 \pm 0.414 a	0.376 \pm 0.376 b	0.416 \pm 0.416 a	0.389 \pm 0.389 b	0.410 \pm 0.410 a
ϕE_0	0.245 \pm 0.245 b	0.259 \pm 0.259 a	0.230 \pm 0.230 b	0.275 \pm 0.275 a	0.227 \pm 0.227 b	0.273 \pm 0.273 a
ϕD_0	0.385 \pm 0.385 b	0.374 \pm 0.374 b	0.387 \pm 0.387 b	0.275 \pm 0.275 d	0.417 \pm 0.417 a	0.335 \pm 0.335 c
δR_0	0.356 \pm 0.356 a	0.369 \pm 0.369 a	0.335 \pm 0.335 a	0.318 \pm 0.318 a	0.325 \pm 0.325 a	0.346 \pm 0.346 a
ϕR_0	0.087 \pm 0.087 a	0.096 \pm 0.096 a	0.077 \pm 0.077 b	0.084 \pm 0.084 a	0.073 \pm 0.073 b	0.093 \pm 0.093 a
PI_{Total}	1.419 \pm 0.131 b	1.808 \pm 0.137 a	1.137 \pm 0.117 b	1.719 \pm 0.108 a	0.956 \pm 0.090 b	2.040 \pm 0.184 a

3.4. Discussão

Diversos estudos têm demonstrado que o selênio combinado com metais pesados diminui a absorção e/ou translocação desses elementos, reduzindo a sua toxicidade (FARGASOVA *et al.*, 2006; MALIK *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2014). Todavia, nas amostras de *B. zebrina* cultivadas *in vitro* a utilização do selênio não interferiu na absorção do zinco, havendo proporcionalidade das concentrações do meio com as concentrações das amostras após os tratamentos (Tabela 1). Resultados como este foram observados por Bluemlein *et al.*, (2009) para *Thunbergia alata* sob estresse por arsênio (As) e, por Cartes *et al.*, (2010) em *Lolium perene* sob estresse por alumínio (Al). Neste último, mesmo não diminuindo a absorção de alumínio, o selênio causou incrementos na capacidade antioxidante das plantas (CARTES, *et al.*, 2010), atuando, dessa maneira, como um agente atenuante do estresse. A interação do selênio com o zinco pode causar

tanto decréscimos (FARGASOVA *et al.*, 2006), quanto incrementos (HU *et al.*, 2015) na absorção do metal. É importante ressaltar que a absorção do selênio e seus efeitos sobre outros elementos podem variar de acordo com a espécie vegetal, a fonte de selênio utilizada, a concentração e a duração da exposição (FENG *et al.*, 2013; LYUBENOVA *et al.*, 2015; EL-RAMADY *et al.*, 2016).

Em todos os tratamentos com selênio houve redução na absorção de enxofre em relação aos tratamentos com zinco isolado (30 μ M Zn e 300 μ M Zn) (Tabela 1). Geralmente, o enxofre exerce efeitos antagônicos na absorção de selênio em plantas devido à competição pelos transportadores de sulfato nas membranas celulares e formação de aminoácidos. (FENG *et al.*, 2013). É conhecido que a redução de sais inorgânicos com selênio é mediada por enzimas que apresentam grupo sulfidrilo (R-S-H), como a glutathione peroxidase. Dessa forma, em casos de estresse causado pelo excesso de selênio em plantas que não acumulam ou metabolizam este elemento, haveria, ocasionalmente, um aumento na absorção de enxofre para incrementar o mecanismo de controle enzimático contra o selênio (TERRY *et al.*, 2000, ZHANG *et al.*, 2007; TAMAOKI *et al.*, 2008; FREEMAN *et al.*, 2010). No entanto, nas amostras tratadas com selênio houve diminuição na concentração de enxofre. Isso sugere que o selênio não apresentou toxicidade às amostras independentemente da concentração de zinco. Ainda, considerando a baixa demanda de enxofre, pode-se inferir que na concentração de selênio utilizada, manteve-se um balanço adequado entre esses dois elementos (Tabela 2).

Os pigmentos fotossintéticos estão intimamente associados às taxas fotossintéticas e à produtividade primária na fase fotoquímica da fotossíntese (BLACKBURN, 2007). As mudanças no teor de pigmentos vegetais, principalmente clorofila e carotenoides podem estar ligadas a sintomas de estresse (JAIN e GOULD, 2015), uma vez que a transferência de elétrons nas membranas dos tilacoides são altamente dependentes da clorofila e dos carotenoides. Diversos trabalhos têm demonstrado um aumento no conteúdo de clorofila em espécies vegetais cultivadas em tratamentos que combinam selênio e outros metais pesados (FILEK *et al.*, 2008; KUMAR *et al.*, 2012; MALIK *et al.*, 2012). Todavia, nas amostras cultivadas sob os tratamentos com zinco isolado e também naqueles combinados com o selênio não houve variação nos níveis de clorofila *a* e clorofila *total* (Figura 1), muito embora tenham apresentado diferentes modulações no aparato fotossintético quando comparadas ao controle.

O selênio pode aumentar os níveis de carotenoides (Fig. 3) quando comparadas as concentrações de zinco combinadas com selênio com suas respectivas concentrações isoladas.

Isso pode contribuir para um incremento da eficiência da fotossíntese, uma vez que antioxidantes não enzimáticos, como os carotenoides, tem papel importante na resposta celular ao estresse oxidativo reduzindo ERO's (MAGER e DE-KRUIJFF, 1995). Os pigmentos carotenoides atuam no processo de proteção das plantas contra estresses ambientais, principalmente, pelo seu eficiente mecanismo de dissipação da energia quando o aparato fotossintético está saturado energeticamente (FRANK *et al.*, 1999; LAMBERS *et al.*, 2008).

Em todos os tratamentos, as amostras de *B. zebrina* apresentaram curvas transientes O-J-I-P com comportamento típico polifásico (STRASSER e STRASSER 1995), com aumento da magnitude dos sinais de fluorescência desde um nível basal (F_0) até um nível máximo (F_M) com pontos intermediários J e I bem definidos (Figura 2A). Essa condição indica que as amostras mantiveram o *pool* de aceptores hábeis em transportar elétrons (SCHANKER *et al.*, 2005). Houve uma supressão da emissão de fluorescência em todas as fases do transiente OJIP nas amostras cultivadas sob 300 μ M Zn+Se e este pode ser um indicativo de maior destinação de energia para o quenching fotoquímico (MÜLLER *et al.*, 2001). Ainda, nos tratamentos com zinco e selênio isolados (0 μ M Zn, 30 μ M Zn, 300 μ M Zn e 0 μ M Zn+Se) observou-se um aumento da emissão de fluorescência no ponto $F_0 = 0,02$ ms e, segundo Jiang *et al.* (2008), maiores valores da emissão da fluorescência basal está associada a eventos de estresse. Essa condição pode ser um indicativo de uma inibição parcial do centro de reação do FSII, diminuindo sua eficiência na captura de energia. Nesse contexto haveria uma diminuição no fluxo de elétrons da quinona A (Q_A) para a quinona B (Q_B).

A avaliação o ΔV_t , derivada de normalizações a partir do transiente OJIP, permite caracterizar a intensidade do comprometimento da dinâmica de transporte de elétrons nos aceptores iniciais do FSII. O ΔV_t , que aparece aproximadamente aos 2 ms (Fig. 3A) é fortemente influenciado pelas reações redox dos aceptores iniciais, principalmente a Q_A (KRUGER *et al.*, 2014; STRASSER *et al.*, 2010). Dessa forma, ΔV_t positivo, como aqueles observados nas amostras cultivadas na presença de 30 μ M Zn e 300 μ M Zn, sugerem que, comparativamente aos tratamentos com selênio, essas concentrações de zinco desencadeiam um efeito acumulativo de Q_A no estado reduzido (Q_A^-) comprometendo a probabilidade de um elétron mover-se para o intersistema em direção ao FSI a partir da Q_A^- (STRASSER *et al.*, 2000). Por outro lado, as bandas-J negativas como aquelas observadas para as amostras sob tratamentos com selênio (Fig. 3A) indicam uma diminuição da velocidade de doação de elétrons da água com consequente incremento de Q_A no estado oxidado, sugerindo assim, um aumento na capacidade

de reoxidar o *pool* de quinonas. Possivelmente em função de um incremento na atividade do FSI como observado por Kruger *et al.*, (2014) e Christen *et al.*, (2007). Dessa forma, pode-se inferir que o selênio é capaz de melhorar a estabilidade do lado acceptor do PSII independentemente das concentrações de zinco testadas, aumentando sua capacidade de reduzir fotoquimicamente a Q_A e assim, mantendo as propriedades cinéticas necessárias para a redução / oxidação da plastoquinona.

O aparecimento da banda-L, aproximadamente aos 0,15 ms, é um indicador da conectividade energética (agrupamento) das unidades do PSII (STRASSER *et al.*, 2004). Assim, uma banda-J negativa como aquelas observadas nas amostras submetidas aos tratamentos com selênio (Figura 3B), indicam maior conectividade energética entre as unidades do PSII (Fig. 3A) e melhor utilização da energia de excitação (STRASSER *et al.*, 1991; STRASSER *et al.*, 2004). O aparecimento da banda-K, aproximadamente aos 0,3 ms (Figura 3C), expressa a atividade de doação de elétrons do CEO para o PSII, que, por sua vez, compete com a doação de elétrons que não são provenientes da água (POLLASTRINI *et al.*, 2017). Uma banda-K negativa como aquelas observadas para as amostras sob tratamentos com Se (Figura 3C), indicam um incremento no funcionamento do CEO e integridade do complexo manganês como descrito por Gururani *et al.*, (2015). Essa condição poderia restringir a entrada de elétrons não provenientes da água, causando assim, maior eficiência do CEO na doação de elétrons para o PSII (DE RONDE *et al.*, 2004). Neste caso, sugere-se que a presença do selênio esteja impossibilitando que doadores de elétrons alternativos transfiram elétrons para o PSII evitando-se a superprodução de feofitina reduzida (Feo^-) e Q_A^- (STRASSER *et al.*, 2000). Uma vez que o CEO, sob efeito atenuante do selênio, reduz o acesso a doadores de elétrons não provenientes da água como o ascorbato (TOTH *et al.*, 2011), prolina (DE RONDE *et al.*, 2004) ou qualquer outro doador interno, aumenta-se a funcionalidade do CEO (GURURANI *et al.*, 2012).

O estudo da associação entre as reações redox dos aceptores iniciais (banda-J), o movimento de tilacóides (banda-L) e dos danos ao CEO (banda K) (STRASSER *et al.*, 2004; OUKARROUM *et al.*, 2007) configuram boas referências para caracterizar distúrbios fisiológicos em plantas. (OUKARROUM *et al.*, 2009). As diferenças negativas observadas para as bandas J, L e K nas amostras cultivadas em 30 μ M Zn e 300 μ M Zn (Figura 3A-C) indicam que sob esses tratamentos, o zinco compromete estrutura do PSII tornando-o mais instável e frágil (LIN *et al.*, 2009). Todavia, quando adicionado o selênio nas amostras, mesmo sob condição de estresse causado pelo zinco, observamos a recuperação da funcionalidade do PSII (Figura 3A-C). Incremento em parâmetros relacionados à fotossíntese têm sido observados em

diferentes espécies submetidas a tratamentos combinados de selênio e metais pesados. Esse efeito pode ser atribuído a diferentes mecanismos fisiológicos promovidos pelo selênio. O principal mecanismo está no aumento da atividade de enzimas antioxidantes como a catalase, peroxidase e superóxido dismutase (FILEK *et al.*, 2010; NAWAZ *et al.*, 2015), bem como de antioxidantes não enzimáticos como o ascorbato e glutatona (ORAGHI-ABDEBILI *et al.*, 2015). Esta ação diminui a oxidação causada por ERO's (SRIVASTAVA *et al.*, 2009) e aumenta os níveis de pigmentos fotossintetizantes (KUMAR *et al.*, 2012).

Avaliando-se a fase I-P, que se refere aos eventos de transferência de elétrons associados ao FSI (SCHANSKER *et al.*, 2003; REDILLAS *et al.*, 2011), as curvas $V_{oi} \geq 1$ apresentaram em maior amplitude comparando-se os tratamentos de zinco combinado com selênio com suas respectivas concentrações de zinco isolado (Figura 4A). Este é um indicativo de modulações na dinâmica de transporte de elétrons do intersistema para o FSI provocada pelo selênio (YUSUF *et al.*, 2010). Além disso, ainda sugerem um aumento do tamanho do pool de aceptores finais de elétrons do lado acceptor do FSI (REDILLAS *et al.*, 2010). Os valores mais expressivos para ΔV_{IP} , também observados para os tratamentos com selênio (Fig 4B), indicam uma maior contribuição relativa da fase I-P para a curva de emissão da fluorescência da clorofila *a* e abundância de unidades do FSI (CEPPI *et al.*, 2012). Schansker *et al.* (2005) demonstraram que o aumento da contribuição relativa da fase I-P para a curva de fluorescência depende tanto do fluxo de elétrons através do FSI quanto de um bloqueio do fluxo de elétrons no lado acceptor do FSI. Neste sentido, o selênio pode induzir mecanismos que incrementam a atividade do FSI. A importância desses mecanismos está na redução da foto-oxidação, direcionando elétrons para rotas alternativas como o fluxo cíclico de elétrons envolvendo o FSI, diminuindo, consequentemente, a formação de espécies reativas ao oxigênio (OUKARROUM *et al.*, 2015) e aumentando a redução de ferredoxina-Fd, outros intermediários e $NADP^+$ (YUSUF *et al.*, 2010, REDILLAS *et al.*, 2011).

Os parâmetros do JIP-test derivados dos transiente OJIP podem ser usados para caracterizar o comportamento/atividade do PSII, intersistema e FSI (STRASSER *et al.*, 2004; STRAUSS *et al.*, 2006; TSIMILLI-MICHAEL e STRASSER *et al.*, 2013). Esses parâmetros são considerados eficazes para localizar diferentes sítios de ação bem como a heterogeneidade do PSII (APPENROTH *et al.*, 2001; KALAJI *et al.*, 2016). O aumento de ABS/RC nas amostras cultivadas nos tratamentos com zinco isolado ou em sua ausência (Tabela 2) pode ser atribuído ao aumento do tamanho funcional da antena associada ao PSII, a qual supre os centros de reação com energia de excitação (YUSUF *et al.*, 2010) e inativação de uma fração de centros de reação

ativos transformando-os em não-redutores de Q_A (YUSUF *et al.*, 2010; REDILLAS *et al.*, 2011). Isso sugere que sob excesso ou escassez de zinco houve um comprometimento na dinâmica de transporte de elétrons do OEC para o FSII (CHEN *et al.*, 2014; KALAJI *et al.*, 2014), como previamente observamos nas diferenças negativas da banda-L (Figura 3B). Todavia, nos tratamentos com selênio houve decréscimo no valor de ABS/RC, possivelmente por uma melhor adaptação da capacidade de coleta de luz pelas antenas do PSII (ZHANG *et al.*, 2013) e incremento na estabilidade dos centros de reação independentemente da concentração de zinco.

A estabilidade dos centros de reação leva a um melhor aproveitamento da energia absorvida. Quando avaliado os parâmetros de rendimento quântico e probabilidades, observou-se que nas amostras cultivadas sob tratamentos com selênio houveram incrementos no rendimento quântico fotoquímico máximo do FSII (ϕP_0), na probabilidade de um éxciton capturado de se mover para além de Q_A^- e no rendimento quântico para transferência de elétrons a partir da Q_A^- para os pontos subsequentes da cadeia de transporte de elétrons. Todo esse cenário, de acordo com Hermans *et al.*, (2003), pode estar relacionado à estabilidade dos centros de reação como redutores de Q_A . Segundo Oukarroum *et al.*, (2009), estas alterações aumentam a eficiência com a qual um fóton absorvido seja capturado pelo centro de reação do PSII. Avaliando-se os parâmetros que caracterizam a transferência de energia após a Q_A^- , considerando a probabilidade de um éxciton capturado de se mover para além de Q_A^- (ψE_0) e o rendimento quântico para o transporte de elétrons (ϕE_0), Também observou-se um incremento nas amostras cultivadas em meios com selênio (Tabela 2). Esses resultados podem ser relacionados com o aumento da estabilidade no aproveitamento de energia evidenciados pelas banda-L (Figura 3B), associados à capacidade do selênio em ampliar a viabilidade celular por meio da reconstrução e melhoria da estabilidade de biomembranas (ZEMBALA *et al.*, 2010; MALIK *et al.*, 2012), aumentando o tamanho dos cloroplastos (FILEK *et al.*, 2010) e protegendo o FSII (FENG *et al.*, 2015).

Decréscimos em RC/ABS referem-se à formação de centros de reação silenciosos (CHEN *et al.*, 2014). Dessa forma, poderíamos inferir que o aumento do rendimento quântico para dissipação de calor observado em todos os tratamentos com zinco isolado ou no controle quando comparados com as respectivas concentrações combinadas com selênio caracterizam uma transformação estrutural dos centros de reação em unidades que dissipam energia de excitação na forma de calor (STRASSER *et al.*, 2004) (Fig. 5). Essa condição poderia evitar a superprodução de Q_A^- (REDILLAS *et al.*, 2011) bem como diminuir a formação de ERO's,

protegendo o sistema da excitação e redução excessiva (CHEN *et al.*, 2014). Todavia, nos tratamentos com selênio observamos melhor desempenho no aproveitamento da energia de excitação, uma vez que houveram redução ϕDo e aumento de RC/ABS. Não houve interferências de nenhum tratamento na transferência de elétrons ao longo do intersistema até a redução dos aceptores finais do FSI, avaliados pela manutenção da eficiência na transferência de elétrons a partir da plastoquinona reduzida até o lado acceptor do FSI (δRo). Isso sugere que o intersistema e o FSI não foram afetados negativamente pelo zinco. Entretanto, incrementos para os tratamentos com 30 μ M Zn+Se e 300 μ M Zn+Se foram observados quando se avaliou o rendimento quântico para a redução dos aceptores finais do FSI (TSIMILLI- MICHAEL e STRASSER, 2008), demonstrando, mais uma vez a capacidade do selênio em melhorar o aproveitamento de energia ao longo do aparato fotossintético. Esse aumento da estabilidade para a redução dos aceptores finais do FSI atribuído ao selênio representa, provavelmente, um aumento do número dos centros de reação associados ao FSI (OUKARROUM *et al.*, 2009).

Finalmente, avaliando o índice de vitalidade PI_{Total} , que representa o produto de vários parâmetros funcionais e estruturais independentes (STRASSER *et al.*, 2004; KALAJI *et al.*, 2016), os maiores valores foram observados para os tratamentos com selênio, independentemente da concentração de zinco. Por incorporar parâmetros que caracterizam todas as fases do transiente OJIP, o PI_{Total} é considerado por vários autores como o mais sensível parâmetro do teste JIP para avaliar o estado fisiológico de plantas sob diferentes condições abióticas (STRASSER *et al.*, 2004; OUKARROUM *et al.*, 2007; YUSUF *et al.*, 2010; BRESTIC e ZIVCAK, 2013; KALAJI *et al.*, 2014,). Incrementos aos valores de PI_{Total} indicam incrementos na habilidade potencial de conservação de energia do aparato fotossintético das espécies (YUSUF *et al.*, 2010). Estes resultados observados para as amostras cultivadas nos tratamentos com selênio podem ser atribuídos principalmente à estabilidade conferida por este elemento ao lado do doador de elétrons de FSII (ZHUO *et al.*, 2017).

3.5. Conclusão

Neste estudo, constatou-se que o selênio é capaz de incrementar a atividade do aparato fotossintético de *B. zebrina* cultivada *in vitro* independente da concentração de zinco. Pode-se atribuir ao selênio a capacidade de melhorar o aproveitamento de energia (PI_{Total}), estabilizando a dinâmica de absorção, captura e transporte do aparato fotossintético de *B. zebrina*, e assim protege as funções do FSII frente a ausência ou excesso de zinco. De acordo com o teste JIP, a despeito da concentração de zinco, não houve interferências significativas na funcionalidade ou

estrutura do aparato fotossintético (avaliando-se ABS/RC, RC/ABS, os rendimentos quânticos e os parâmetros de eficiência). Considerando que a absorção do zinco foi proporcional à concentração dos tratamentos, sugere-se, que a espécie *B. zebrina* exiba eventual capacidade para acumulação de zinco, apresentando, dessa forma, potenciais características para biomonitoramento.

3.6. Referências

- APPENROTH, K. J.; STÖCKEL, J.; SRIVASTAVA, A.; STRASSER, R.J. Multiple effects of chromate on the photosynthetic apparatus of *Spirodela polyrhiza* as probed by OJIP chlorophyll a fluorescence measurements. **Environmental Pollution**, v. 115, p. 49–64. 2001.
- ARNON, D. I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. **Plant Physiology**, v. 24, p.1-15. 1949.
- BLACKBURN G. A. Hyperspectral remote sensing of plant pigments. **Journal of Experimental Botany**, v. 58, p. 855-867. 2007.
- BLUEMLEIN, K.; KLIMM, E.; RAAB, A.; Feldmann, J. Selenite enhances arsenate toxicity in *Thunbergia alata*. *Environmental Chemistry*, v. 6 (6), p. 486–494. 2009.
- BRESTIC, M.; ZIVCAK, M. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: Das, A. B.; Rout, G. R. (eds.) **Molecular stress physiology of plants**. Springer, New Dehli, pp 87–131. 2013.
- CARTES, P.; GIANFREDA, L.; PAREDES, C.; MORA, M. L. The effect of seed pelletization with selenite on the yield and selenium uptake of ryegrass cultivars. In: **19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World**, Brisbane, Australia, pp. 310–313. 2010.
- CEPPI, M. G.; OUKARROUM, A.; CIÇEK, N.; STRASSER, R. J.; SCHANSKER, G. The IP amplitude of the fluorescence rise OJIP is sensitive to changes in the photosystem I content of leaves: a study on plants exposed to magnesium and sulfate deficiencies, drought stress and salt stress. **Physiologia Plantarum**, v. 144, p. 277–288. 2012.
- CHEN, Q.; GUAN, T.; YUN, L.; LI, R.; RECKNAGEL, F. Online forecasting chlorophyll a concentrations by an auto-regressive integrated moving average model: feasibilities and potentials. **Harmful Algae** v. 43, p. 58–65. 2015.
- CHEN, S. G.; STRASSER, R. J.; QIANG, S. In vivo assessment of effect of phytotoxin tenuazonic acid on PSII reaction centers. *Plant Physiology and Biochemistry*, v. 84, p. 10–21. 2014.
- CHRISTEN, D.; SCHONMANN, S.; JERMINI, M.; STRASSER, R. J.; DÉFAGO, G. Characterization and early detection of grapevine (*Vitis vinifera*) stress responses to esca disease by *in situ* chlorophyll fluorescence and comparison with drought stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 504-514. 2007.
- DE RONDE, J. A.; CRESS, W. A.; KRUGER, G. H. J. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an *Arabidopsis* P5CR gene, during heat and drought stress. **Journal of Plant Physiology**, v. 161, p. 1211-1224. 2004.
- DJANAGUIRAMAN, M.; PRASAD, P. V. V.; SEPPANEN, M. Selenium protects sorghum leaves from oxidative damage under high temperature stress by enhancing antioxidant defense system. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 48, p. 999–1007. 2010.
- EL-RAMADY, H.; ABDALLA, N.; TAHA, H.; ALSHAAL, T.; EL-HENAWY, A.; FAIZY, S.; SHAMS, M.; YOUSSEF, S.; SHALABY, T.; BAYOUMI, Y.; ELHAWAT, N.; SHEHATA, S.; SZTRIK, A.; PROKISCH, J.; FÁRI, M.; DOMOKOS-SZABOLCSY, É.; PILON-SMITS,

E.; SELMAR, D.; HANEKLAUS, S.; SCHNUG, E. Selenium and nano-selenium in plant nutrition. **Environmental Chemistry Letters**, v. 14, p. 123–147. 2016.

FARGASOVA, A.; PASTIEROVA, J.; SVETKOVA, K. Effect of Se-metal pair combinations (Cd, Zn, Cu, Pb) on photosynthetic pigments production and metal accumulation in *Sinapis alba* L. seedlings. **Plant, Soil and Environment**, v. 52(1), p. 8–15. 2006.

FEIGL, G.; LEHOTAI, N.; MOLNAR, A.; ORDOG, A.; RODRÍGUEZ-RUIZ, M.; PALMA, J. M.; CORPAS, F. J.; ERDEI, L.; KOLBERT, Z.; Zinc induces distinct changes in the metabolism of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) in the roots of two Brassica species with different sensitivity to zinc stress. **Annals of Botany**, v. 116, p. 613–625. 2015.

FENG, R.; CHAOYANG W.; SHUXIN T. The roles of selenium in protecting plants against abiotic stresses. **Environmental and Experimental Botany**, v. 87, p. 58–68. 2013.

FENG, R.; WEI, C. Antioxidative mechanisms on selenium accumulation in *Pteris vittata* L., a potential selenium phytoremediation plant. **Plant Soil and Environment**, v. 58, p. 105–110. 2012.

FIGUEIREDO, A. M. G.; NOGUEIRA, C. A.; MARKERT, B.; HEIDENREICH, H.; FRÄNZLE, S.; LIEPELT, G.; SAIKI, M.; DOMINGOS, M.; MILIAN, F. M.; HERPIN, U. The use of an epiphyte (*Tillandsia usneoides* L.) as bioindicator of heavy metal pollution in São Paulo, Brazil. - In: Morrison, G.; Rauch, S. (eds.): **Highway and Urban Environment**. pp. 249-257. Springer, Dordrecht - Heidelberg - London - New York. 2007.

FILEK, M.; KOSCIELNIAK, J.; LABANOWSKA, M.; BEDNARSKA, E.; BIDZINSKA, E. Selenium-induced rotection of photosynthesis activity in rape (*Brassica napus*) seedlings subjected to cadmium stress. Fluorescence and EPR measurements. **Photosynthesis Research**, v. 105, p. 27-37, 2010.

FILEK, M.; KOŚCIELNIAK, J.; LABANOWSKA, M.; BEDNARSKA, E.; BIDZIŃSKA, E. Selenium-induced protection of photosynthesis activity in rape (*Brassica napus*) seedlings subjected to cadmium stress. Fluorescence and EPR measurements. **Photosynthesis Research**, v. 105, p. 27-37. 2010.

FRANK H. A.; YOUNG A. J.; BRITTON, G.; COGDELL R. J. The photochemistry of carotenoids. In: **Advances in Photosynthesis and Respiration**. Govindjee (ed.), vol. 8. Dordrecht: Kluwer Academic.1999

FREEMAN, J. L.; TAMAOKI, M.; STUSHNOFF, C.; QUINN, C. F.; DEVONSHIRE, J.; FAKRA, S. C.; MARCUS, M. A.; MCGRATH, S. P.; HOEWYK D.V., PILONSMITS A.H.E. Molecular mechanisms of selenium tolerance and hyperaccumulation in *Stanleya pinnata*. **Plant Physiology**, v. 153, p. 1630–1652. 2010.

GURURANI, M. A.; VENKATESH, J.; GANESAN, M.; STRASSER, R. J.; HAN, Y.; KIM, J. I.; LEE, H. Y.; SONG, P. S. (2015). In Vivo Assessment of Cold Tolerance through Chlorophyll-*a* Fluorescence in Transgenic Zoysiagrass Expressing Mutant Phytochrome A. **PLoS ONE**, v. 10. 2015.

HERMANS, C.; SMEYERS, M.; RODRIGUEZ, R. M.; EYLETTERS, M.; STRASSER, R. J.; DELHAYE, J-P. Quality assessment of urban trees: a comparative study of physiological

characterisation, airborne imaging and on site fluorescence monitoring by the OJIP-test. **Journal of Plant Physiology**. 160:81-90. 2003.

HOFMANN, N. R. Nicotianamine in Zinc and Iron Homeostasis. **The Plant Cell**, v. 24, p. 373. 2012.

HU, Y.; NORTON, G. J.; DUAN, G.; HUANG, Y.; LIU, Y. Effect of selenium fertilization on the accumulation of cadmium and lead in rice plants. **Plant Soil**, v. 384(1–2), p. 131–140. 2014.

JAIN, G., GOULD, K.S.: Functional significance of betalain biosynthesis in leaves of *Disphyma australe* under salinity stress. – **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 131-140, 2015.

KALAJI, H. M.; OUKARROUM, A.; ALEXANDROV, V.; KOUZMANOVA, M.; BRESTIC, M.; ZIVCAK, M.; SAMBORSKA, I. A.; CETNER, M. D.; ALLAKHVERDIEV, S. I.; GOLTSEV V. Identification of nutrient deficiency in maize and tomato plants by in vivo chlorophyll a fluorescence measurements. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 30, p. 1-10. 2014.

KRÜGER, G. H. J.; DE VILLIERS, M. F; STRAUSS, A. J.; DE BEER, M.; VAN HEERDEN, P. D. R.; MALDONADO, R.; STRASSER, R. J. Inhibition of photosystem II activities in soybean (*Glycine max*) genotypes differing in chilling sensitivity. **South African Journal of Botany**, v. 95, p. 85-96. 2014.

KUMAR, M.; BIJO, A. J.; BAGHEL, R. S.; REDDY, C. R. K.; JHA B. Selenium and Spermine alleviates cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidant system and DNA methylation. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 51, p. 129–138. 2012.

KUPPER, H.; ANDRESEN, E. Mechanisms of metal toxicity in plants. **Metallomics**, v. 8, p. 269–285. 2016.

KUZNETSOV, V. V.; KHOLODOVA, V. P.; KUZNETSOV, V. I. V.; YAGODIN, B. A. Selenium regulates the water status of plants exposed to drought. **Doklady Bioogical Sciences** v. 390, p. 266–268. 2003.

LAMBERS, H.; CHAPIN III, F. S.; PONS, T. L. **Plant Physiological Ecology**. 2 ed. Springer, pp. 604. 2008

LAVERGNE, J.; LECI, E.; Properties of inactive photosystem II centers. **Photosynthesis Research**, v. 35, p. 323–343. 1993.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, p. 350-382. 1987.

LIN, Z.H., CHEN, L.S., CHEN, R.B., ZHANG, F.Z., JIANG, H.X., TANG, N.: CO₂ assimilation, ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase, carbohydrates and photosynthetic electron transport probed by the JIP-test, of tea leaves in response to phosphorus supply. **BMC Plant Biology**, v. 9 (43), p. 1-12. 2009.

LYUBENOVA, L.; SABODASH, X.; SCHRÖDER, P.; MICHALKE, B. Selenium species in the roots and shoots of chickpea plants treated with different concentrations of sodium selenite. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, p. 16978– 16979. 2015.

MAGER W.H., DE KRUIJFT A.J.I. Stress-induced transcriptional activation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 59, p. 506–531. 1995.

MALIK, J. A.; GOEL, S.; KAUR, N.; SHARMA, S.; SINGH, I.; NAYYAR H. Selenium antagonizes the toxic effects of arsenic on mungbean (*Phaseolus aureus* Roxb.) plants by restricting its uptake and enhancing the antioxidative and detoxification mechanisms. **Environmental and Experimental Botany**, v. 77, p. 242–248. 2012.

MARTINS, J. P. R.; MARTINS¹, A. D.; FERREIRA PIRES, M. F.; BRAGA JUNIOR, R. A.; REIS, R. O.; DIAS, G. M. G.; PASQUAL, M. Anatomical and physiological responses of *Billbergia zebrina* (Bromeliaceae) to copper excess in a controlled microenvironment. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 126(1), p. 43–57. 2016.

MARTINS, J. P.R.; SCHIMILDT, E. R.; ALEXANDRE, R. S.; FALQUETO, A. R.; OTON, W.C. Chlorophyll *a* fluorescence and growth of *Neoregelia concentrica* (Bromeliaceae) during acclimatization in response to light levels. **In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant**, v. 51, p. 471–481. 2015.

MUKHOPADHYAY, M.; DAS, A.; SUBBA, P.; BANTAWA, P.; SAKRAR, B.; GHOSH, P. Structural, physiological, and biochemical profiling of tea plants under zinc stress. **Biologia Plantarum**, v. 57, p. 474–480. 2013.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, v. 15, p. 473–497. 1962.

NAWAZ, F.; AHMAD, R.; ASHRAF, M. Y.; WARAICH, E. A.; KHAN, S. Z. Effect of selenium foliar spray on physiological and biochemical processes and chemical constituents of wheat under drought stress. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.113, p. 191–200. 2015.

ORAGHI-ABDEBILI, Z.; ORAGHI, A. N.; JALILI, S.; SAFIALLAH, S. The modified qualities of basil plants by selenium and/or ascorbic acid. **Turkish Journal of Botany**, v. 39, p. 401–407. 2015.

OUKARROUM, A.; BUSSOTTI, F.; GOLTSEV, V.; HAZEM, M.; KALAJI, H. M. Correlation between reactive oxygen species production and photochemistry of photosystems I and II in *Lemna gibba* L. plants under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 109, p. 80–88. 2015.

OUKARROUM, A.; MADIDI, S. E. L.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Probing the responses of barley cultivars (*Hordeum vulgare* L.) by chlorophyll *a* fluorescence OLKJIP under drought stress and re-watering. **Environmental and Experimental Botany**, v. 60, p. 438–446. 2007.

OUKARROUM, A.; SCHANSKER, G.; STRASSER, R. J. Drought stress effects on photosystem I content and photosystem II thermotolerance analyzed using Chl *a* fluorescence kinetics in barley varieties differing in their drought tolerance. **Physiologia Plantarum**, v. 137, p. 188–199. 2009.

POLLASTRINI, M.; NOGALES, A. G.; BENAVIDES, R.; BONAL, D.; FINER, L.; FOTELLI, M.; GESSLER, A.; GROSSIORD, C.; RADOGLOU, K.; STRASSER, R. J.; BUSSOTTI, F. Tree diversity affects chlorophyll *a* fluorescence and other leaf traits of tree species in a boreal forest. **Tree Physiology**, v. 00, p. 1–10. 2017.

- REDILLAS, M.C.F.R., STRASSER, R.J., JEONG, J.S., KIM, Y.S., KIM, J.K.: The use of JIP test to evaluate drought-tolerance of transgenic rice overexpressing OsNAC10. **Plant Biotechnology Reports**, v. 5, p.169-175. 2011.
- SCHANSKER, G.; SRIVASTAVA, A.; GOVINDJEE, STRASSER, R. J. Characterization of the 820-nm transmission signal paralleling the chlorophyll *a* fluorescence rise (OJIP) in pea leaves. **Functional Plant Biology**, v. 30, p. 785–796. 2003.
- SCHANSKER, G.; TÓTH, S. Z.; STRASSER, R. J.; Methylviologen and dibromothymoquinone treatments of pea leaves reveal the role of photosystem I in the Chl *a* fluorescence rise OJIP. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1706, p. 250-261. 2005.
- SEPPANEN, M.; TURAKAINEN, M.; HARTIKAINEN, H, Selenium effects on oxidative stress in potato. **Plant Science**, v. 165, p. 311–319. 2003.
- SRIVASTAVA, M.; MA, L. Q.; RATHINASABAPATHI, B.; SRIVASTAVA, P. Effects of selenium on arsenic uptake in arsenic hyperaccumulator *Pteris vittata* L. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 1115–1121. 2009.
- STRASSER, B. J. Donor side capacity of Photosystem II probed by chlorophyll *a* fluorescence transients. **Photosynthesis Research**, v. 52, p. 147-155. 1997.
- STRASSER, B. J.; STRASSER, R. J. Measuring fast fluorescence transient to address environmental questions: The JIP-test. In: P. Mathis (ed.), **Photosynthesis: from Light to Biosphere**, pp.977-980. Springer Netherlands. 1995.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. Analysis of fluorescence transient, In: G. Papageogiou, Govindjee (eds.), **Chlorophyll Fluorescence: a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and Respiration**, Springer, Dordrecht, 2004. v. 19, p. 321-362.
- STRASSER, R. J.; SRIVASTAVA, A.; TSIMILLI-MICHAEL, M. The fluorescence transiente as a tool to characterize and screen photosynthetic samples. In YUMUS, M.; PATHRE, U.; MOHANTY, P (eds.), **Probing Photosyntesis: Mechanisms, Regulation and Adaptation**, Taylor & Francis, 445-483 p. 2000.
- STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; QIANG, S.; GOLTSEV, V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodopensis*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1313–1326, 2010.
- STRAUSS, A. J.; KRÜGER, G. H. J.; STRASSER, R. J.; HEERDEN, P.D.R.V. Ranking of dark chilling tolerance in soybean genotypes probed by the chlorophyll *a* fluorescence transient O-J-I-P. **Environmental and Experimental Botany**, v. 56, p. 147–157. 2006.
- TAMAOKI, M.; FREEMAN, J. L.; PILON-SMITS, E. A. H. Cooperative ethylene and jasmonic acid signaling regulates selenite resistance in arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 146, p. 1219–1230. 2008.
- TERRY, N.; ZAYED, A. M.; DE SOUZA, M. P.; TARUN, A. S. Selenium in higher plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 51, p. 401-432. 2000.

TOTH, S. Z.; NAGY, V.; PUTHUR, J. T.; KOVACS, L.; AND GARAB, G. **Plant Physiology**, v. 156, p. 382-392. 2011.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. *In vivo* assessment of plants' vitality: applications in detecting and evaluating the impact of Mycorrhization on host plants, In: Varma, A. (ed.), **Mycorrhiza: State of the Art, Genetics and Molecular Biology, Eco- Function, Biotechnology, Eco-Physiology, Structure and Systematics**, Springer, Dordrecht, 2008, pp. 679-703.

TSIMILLI-MICHAEL, M.; STRASSER, R. J. The energy flux theory 35 years later: formulations and applications. **Photosynthesis Research**, v. 117, p. 289–320. 2013.

VALKAMA, E.; KIVIMÄENPÄÄ, M.; HARTIKAINEN, H.; WULFF A. The combined effects of enhanced UV-B radiation and selenium on growth, chlorophyll fluorescence and ultrastructure in strawberry (*Fragaria × ananassa*) and barley (*Hordeum vulgare*) treated in the field. **Agricultural and Forest Meteorology**, v. 120, p. 267–278. 2003.

VAN ASSCHE, F.; CLIJSTERS, H. Effects of metals on enzyme activity in plants. **Plant, Cell & Environment** v. 13, p. 195–206. 1990.

YUSUF, M. A.; KUMAR, D.; RAJWANSHI, R.; STRASSER, R. J.; TSIMILLI-MICHAEL, M.; GOVINDJEE; SARIN, N. B. Overexpression of γ -tocopherol methyl transferase gene in transgenic *Brassica juncea* plants alleviates abiotic stress: Physiological and chlorophyll a fluorescence measurements. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1797, p. 1428-1438. 2010.

ZEMBALA, M.; FILEK, M.; WALAS, S.; MROWIEC, H.; KORNAŚ, A.; MISZALSKI, Z.; HARTIKAINEN, H. Effect of selenium on macro- and microelement distribution and physiological parameters of rape and wheat seedlings exposed to cadmium stress. **Plant and Soil**, v. 329, p. 457–468. 2010.

ZHANG M, TANG S, HUANG X, ZHANG F, PANG Y, HUANG Q, and YI Q. 2014. Selenium uptake, dynamic changes in selenium content and its influence on photosynthesis and chlorophyll fluorescence in rice (*Oryza sativa* L.). **Environmental and Experimental Botany**, v. 100, p. 39-45. 2014.

ZHANG, L.; ACKLEY, A. R.; PILON-SMITS, E. A. H. Variation in selenium tolerance and accumulation among *Arabidopsis thaliana* accessions. **Plant Physiology**, v. 164, p. 327–336. 2007.

ZHUO, Y.; QIUA, S.; AMOMBO, E.; ZHU, Q.; TANG, D.; HUANG, M.; HAN, X.; CHEN, L.; WANG, S.; CHEN, K.; SUN, J. Nitric oxide alleviates cadmium toxicity in tall fescue photosystem II on the electron donor side. **Environmental and Experimental Botany**, v. 137, p. 110–118. 2017.

4. Considerações finais

O objetivo dessa pesquisa foi caracterizar a ação do selênio (Se) sobre o aparato fotossintético de *B. zebrina* e sua potencial ação atenuante frente ao excesso e escassez de zinco *in vitro*. Estudos relacionados aos mecanismos fisiológicos de ação do selênio ainda são escassos e pouco conclusivos. Espera-se que os resultados dessa pesquisa possam contribuir para esclarecer acerca dos mecanismos fisiológicos subjacentes à toxicidade e incrementos causados pelo Se. Ainda, elucidar sobre a mitigação de estresses abióticos pelo uso de doses adequadas de Se sobre a cadeia de transporte de elétrons nas plantas.

Este estudo mostrou que, sob uma concentração adequada, o Se pode aumentar a capacidade potencial de conservação de energia no aparato fotossintético e manter a estabilidade das reações de transporte de energia no FSII em *B. zebrina*. Todavia, observou-se que a espécie não tolera concentrações iguais ou superiores a 16µM de selênio, apresentando reduções no crescimento, conteúdo de pigmentos fotossintéticos e desestabilidade na estrutura e funcionalidade do aparato fotossintético, especialmente no FSII.

Quando combinado com o zinco (Zn), verificou-se que o selênio é capaz de incrementar a atividade do aparato fotossintético de *B. zebrina* cultivada *in vitro* independente da concentração de Zn. O selênio pode melhorar o aproveitamento de energia, protegendo, dessa maneira, as funções do FSII. Apesar da concentração de zinco, não houveram interferências significativas na funcionalidade ou estrutura do aparato fotossintético. Ainda, com a absorção do Zn proporcional à concentração, observou-se que a espécie *B. zebrina* apresenta uma eventual capacidade para acumulação de zinco, exibindo potenciais características para biomonitoramento.

Além de contribuir para o entendimento da ação fisiológica do selênio nas plantas, os resultados apresentados podem ser de importância para a produção de mudas de espécies ornamentais *in vitro*, fortificação de espécies para introdução de indivíduos em áreas de reflorestamento, mitigação dos efeitos de metais pesados em plantas presentes em ambientes impactados e aplicações para espécies vulneráveis e em extinção.

